



**Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática**

**EPIGENÉTICA Y OBESIDAD: DILUCIDANDO QUÉ OCURRE EN
LAS NEURONAS POMC**



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**VALENTINA PAZ OPAZO MELLADO
CONCEPCIÓN, CHILE
2023**

Profesora guía de tesis: Dra. Estefanía Salomé Tarifeño Saldivia
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesora co-guía de tesis: Dra. María de los Ángeles García Robles
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dra. Estefanía Salomé Tarifeño Saldivia

Profesora guía de tesis
Universidad de Concepción

Dra. María de los Ángeles García Robles

Profesora co-guía de tesis
Universidad de Concepción



Dr. Fernando Sepúlveda Briceño

Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dr. Leonardo Gutiérrez Contreras

Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dra. Karina Oyarce Merino

Profesor evaluador externo
Universidad de San Sebastián

Dra. Elena Amparo Uribe Pérez
Directora
Magíster Bioquímica y Bioinformática
Universidad de Concepción



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	16
1. Homeostasis energética y obesidad	16
2. Función del núcleo arqueado en la regulación de la ingesta alimentaria.	17
3. Procesamiento de POMC	23
4. Efecto de la obesidad en neuronas hipotalámicas	25
5. Modificaciones epigenéticas	33
5.1 Rol de la metilación de ADN en la regulación transcripcional	34
5.2 Metilación de ADN en neuronas POMC	38
II. HIPOTESIS	41
III. OBJETIVOS	42
Objetivo General:	42
Objetivos específicos:	42
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Aprobación bioética del diseño experimental y manejo de animales	43
2. Generación de animales obesos inducidos por una dieta alta en grasas.	43
2.1 Medición de glicemia y perfil lipídico	44
3. Purificación de neuronas POMC por medio de la técnica FACS	45
4. Extracción y medición de concentración de ADN genómico	49
5. Secuenciación del metiloma de neuronas POMC	49
6. Análisis bioinformático, control de calidad de los datos	51
6.2 Alineamiento al genoma de referencia e identificación del estado de metilación	52

6.3	Análisis de metilación diferencial	55
6.4	Asociación entre metilación de ADN y expresión génica	57
6.5	Análisis de enriquecimiento funcional	59
7.	Análisis estadístico.....	60
V.	RESULTADOS	61
1.	Caracterización de los ratones obesos inducidos por dieta	61
2.	El protocolo de FACS permite una purificación eficiente de neuronas POMC:eGFP	63
3.	Caracterización del estado de metilación a nivel de genoma completo en neuronas POMC en ratones controles y obesos.....	66
4.	La obesidad inducida por una dieta alta en grasas genera cambios en el patrón de metilación del ADN de neuronas POMC principalmente en motivos de unión a factores de transcripción.	75
5.	La obesidad inducida por una dieta rica en grasa saturada modula el estado de metilación del ADN en neuronas POMC pudiendo modular vías biológicas importantes para el funcionamiento y comunicación de estas neuronas	80
VI.	DISCUSIÓN.....	87
VII.	BIBLIOGRAFÍA	106
VIII.	ANEXOS.....	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Set de index utilizados para cada muestra	50
Tabla 2.	Testeo de diferentes parámetros de alineamiento	53
Tabla 3:	Estadística del cambio de metilación y expresión génica de genes modulados por la dieta alta en grasa	85
Tabla 4:	Estadística del cambio de metilación y expresión génica de genes no modulados por la dieta alta en grasa	86

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Sistema de melanocortina.....	22
Figura 2: Procesamiento de la prohormona POMC.....	24
Figura 3: Mecanismos moleculares propuestos de resistencia a leptina en neuronas hipotalámicas.	29
Figura 4: Reacción de conversión del bisulfito	38
Figura 5. Diseño experimental para generar animales obesos inducidos por dieta HFD.....	44
Figura 6: Protocolo de disgregación de células hipotalámicas	48
Figura 7: Efecto de la dieta alta en grasas en ratones POMC:eGFP	63
Figura 8: Purificación de células POMC:eGFP mediante FACS.....	66
Figura 9: Procesamiento bioinformático de muestras rrbs-seq	69
Figura 10: Caracterización del estado de metilación del ADN de neuronas POMC en condición CD y HFD	73
Figura 11: Caracterización de los efectos de la dieta rica en grasa en el perfil de metilación y la expresión de las neuronas POMC	78
Figura 12: Respuesta transcriptómica asociada a neuronas POMC de sujetos obesos inducidos por una dieta alta el grasa	83

ABREVIATURAS

3V	:	Tercer ventrículo
5-hmC	:	5-hidroximetilcitosina
5-mC	:	5-metilcitosina
A	:	Adenina
ACTH	:	Hormona corticotropina
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
AGRP	:	Proteína relacionada-agutí
Aif1	:	Factor inflamatorio aloinjerto 1
ApoH	:	Apolipoproteína H
ARC	:	Núcleo arqueado
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARN pol II	:	ARN polimerasa II
ARNm	:	ARN mensajero
ARNsc-seq	:	Secuenciación de ARN de célula única
BSA	:	Albúmina sérica bovina
BS-seq	:	Secuenciación de bisulfito
C	:	Citosina
CART	:	Transcrito regulado por anfetamina y cocaína
Cartpt	:	Prepropéptido del transcrito regulado por anfetamina y cocaína
Ccno	:	Ciclina O
CD	:	Dieta control
cols	:	Colaboradores
CPE	:	Carboxipeptidasa E
CpG	:	Dinucleótido CG

CREAV	:	Centro Regional de Estudios Avanzados para la Vida
CRH	:	Hormona liberadora de corticotropina
DMC	:	Citosina diferencialmente metilada
DMR	:	Región diferencialmente metilada
DNMT	:	ADN metil transferasa
E2F	:	Transcription factor E2F
EDTA	:	Ácido Etilendiamino tetracético
eGFP	:	Proteína fluorescente verde mejorada
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	:	Eminencia Media
Emx1	:	Espiráculos vacíos Homeobox 1
EP	:	Endorfina
EPA	:	Ácido eicosapentaenoico
FACS	:	Selección de células activada por fluorescencia
FDR	:	Tasa de descubrimiento falso
Foxb1	:	Caja de horquilla B1
FOXO1	:	Caja de horquilla O1
FSC	:	Forward scatter
G	:	Guanina
GABA	:	Ácido gamma-aminobutírico
Gal	:	Galanina
Gdnf	:	Factor neurotrófico derivado de glía
Gfap	:	Proteína ácida fibrilar de glía
GMAP	:	Péptido asociado al mensaje de galanina
Gpsm3	:	Modulador de señalización de proteína G 3

GO	:	Ontología génica
HBSS	:	Solución salina equilibrada de Hanks
HDL	:	lipoproteína de alta densidad
HEK	:	Células embrionarias de riñón
HFD	:	Dieta alta en grasa
IKK	:	Inhibidor de la subunidad beta de la quinasa del factor kappa B nuclear
IL	:	Interleucina
IMC	:	Índice de masa corporal
IRE1	:	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease
JP	:	péptido de unión
kb	:	kilo base
LDL	:	Lipoproteína de baja densidad
Lox13	:	Homólogo 3 de lisil oxidasa
LPH	:	Lipotropina
MBD	:	Dominio de unión a metil-CpG
MC3R	:	Receptor de melanocortina 3
MC4R	:	Receptor de melanocortina 4
MCT2	:	Transportador de monocarboxilato 2
MeCP2	:	Proteína 2 de unión a metil-CpG
Moap1	:	Modulador de apoptosis 1
MSH	:	Hormona melanocito estimulante
MT	:	Mitocondrial
N	:	Base no determinada
NaOH	:	Hidróxido de sodio
N-AT	:	N-acetiltransferasa

NF	:	Factor nuclear
ng	:	nanogramo
NPY	:	Neuropéptido Y
Ntrk1	:	Receptor tirosina quinasa neurotrófica tipo 1
PAM	:	Monooxigenasa amidante de peptidil-glicina α
PBS	:	Solución tampón de fosfatos
PC	:	Convertasa prohormonales
PCA	:	Análisis de componente principal
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	:	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2-alfa quinasa 3
PIP3	:	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
POMC	:	Proopiomelanocortina
PTP1B	:	Proteína-tirosina fosfatasa 1B
PVN	:	Núcleo paraventricular
qRT-PCR	:	PCR cuantitativa
RE	:	Retículo endoplasmático
rpm	:	Revoluciones por minuto
RRBS	:	Secuenciación de bisulfito de representación reducida
SAH	:	S-adenosil homocisteína
SAM	:	S-adenosil metionina
SBF	:	Suero fetal bovino
SOCS3	:	Supresor de la Señalización de Citoquinas 3
SP1	:	Factor de transcripción Sp1
SSC	:	Side scatter
STAT3	:	Transductor de señal y activador de la transcripción 3

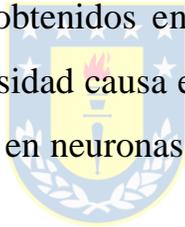
T	:	Timina
TET	:	Translocación diez-once
TF	:	Factor de transcripción
TNF	:	Factor de necrosis tumoral
TPM	:	Transcritos por millón
TRH	:	Hormona liberadora de tirotropina
TSS	:	Sitio de inicio de la transcripción
Vim	:	Vimentina
WGBS	:	Secuenciación de bisulfito de genoma completo
μm	:	Micrómetro



RESUMEN

Las neuronas hipotalámicas POMC desempeñan un papel importante en el comportamiento alimentario, ya que pueden disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético en respuesta a las necesidades metabólicas. Sin embargo, múltiples evidencias han demostrado que, tras el desarrollo de obesidad, estas neuronas sufren diversas alteraciones en su normal funcionamiento que afectan su capacidad de inhibir el apetito. Un mecanismo molecular que podría estar involucrado en el desarrollo y/o mantención de estas alteraciones es la metilación del ADN, puesto que tiene la capacidad de regular la expresión génica y está fuertemente influenciada por factores ambientales como la exposición a dietas calóricas. Además, en particular con el gen *Pomc*, diferentes investigaciones han mostrado que la obesidad induce la hipermetilación de su promotor, interrumpiendo la señalización normal de la leptina; no obstante, aún se desconocen los efectos a nivel genómico. En este contexto, nos analizamos los efectos de la obesidad sobre el metiloma de las neuronas POMC y asociarlo con cambios en la expresión génica. Para ello, se expuso a ratones transgénicos POMC:eGFP machos a una dieta alta en grasas durante 11 semanas para inducir obesidad mediante dieta. Desde neuronas POMC purificadas por FACS se prepararon librerías de secuenciación de bisulfito de representación reducida (RRBS), luego de lo cual, se efectuó un análisis de metilación diferencial por locus CpG. Paralelamente, se utilizaron datos de RNA-seq generados a partir de neuronas POMC sometidas al mismo tratamiento (11 semanas de alimentación y purificación por FACS) para correlacionar los cambios de metilación con cambios en la expresión génica. Nuestros resultados revelan que la obesidad

inducida por el consumo de una dieta alta en grasa provoca una profunda modulación del metiloma en las neuronas POMC caracterizada principalmente por la metilación en promotores proximales de los genes y, más específicamente, dentro de motivos de unión a factores de transcripción. Estos cambios en el estado de metilación, si bien ocurren en varios genes relevantes en el funcionamiento de las neuronas POMC (como *Pomc*, *Cartpt* y *Stat3*), no necesariamente están asociados con una modulación transcriptómica. De la respuesta transcripcional asociada a un cambio de metilación, destaca el aumento de *Gal* y *Loxl3*, genes asociados al consumo de grasa y señalización de STAT3, respectivamente; así como la disminución de genes anti apoptóticos como *Gdnf* y *Ntrk1*. De esta manera, es importante considerar que los resultados obtenidos en esta tesis son los primeros en dilucidar los efectos que la obesidad causa en la metilación de ADN a nivel genómico y más específico aún en neuronas POMC purificadas



ABSTRACT

Hypothalamic POMC neurons play an important role in feeding behavior, as they can decrease food intake and increase energy expenditure in response to metabolic needs. However, multiple investigations have shown that, after the development of obesity, these neurons undergo several alterations in their normal functions that affect their ability to inhibit appetite. A molecular mechanism that could be involved in the development and/or maintenance of these alterations is DNA methylation since it has the capacity to regulate gene expression and is influenced by environmental factors such as exposure to caloric diets. Furthermore, obesity has been shown to induce DNA hypermethylation at the *Pomc* promoter disrupting normal leptin signaling, but the effects at the genomic level are still unknown. In this context, we set out to analyze the effects of obesity on the methylome of POMC neurons and associate it with changes in gene expression. For this purpose, male POMC:eGFP transgenic mice were exposed to a high-fat diet for 11 weeks to induce obesity by diet. From FACS-purified POMC neurons, reduced-representation bisulfite sequencing (RRBS) libraries were prepared, after which differential methylation analysis per CpG locus was performed. In parallel, RNA-seq data generated from POMC neurons subjected to the same treatment (11 weeks of FACS feeding and purification) were used to correlate methylation changes with changes in gene expression. Our results reveal that obesity causes profound modulation of the methylome in POMC neurons characterized primarily by methylation in promoter regions of genes and, more specifically, within transcription factor binding motifs. These changes in methylation status, although occurring in several genes relevant to POMC

neuron function (such as *Pomc*, *Cartpt* and *Stat3*), are not necessarily associated with transcriptomic modulation. Of this transcriptional response, associated with a change in methylation, the increase in *Gal* and *Loxl3*, genes associated with fat consumption and STAT3 signaling, respectively, stands out, as well as the decrease in anti-apoptotic genes such as *Gdnf* and *Ntrk1*. In this way, it is important to consider that the results obtained in this thesis are the first to elucidate the effects that obesity causes in DNA methylation at the genomic level and even more specifically in purified POMC neurons.



I. INTRODUCCIÓN

1. Homeostasis energética y obesidad

La obesidad es una patología crónica caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa en el organismo y que constituye un riesgo para la salud. Para diagnosticar obesidad se emplea el índice de masa corporal IMC o del inglés body mass index (BMI), definiéndose sobrepeso cuando este valor está sobre 25 y obesidad cuando es igual o superior a 30 (World Health Organization, 2021). En los últimos años, la prevalencia de la obesidad ha tenido un incremento importante, llegando a convertirse en una epidemia a nivel global, de hecho, la Organización Mundial de la Salud informó en marzo del año 2022 que más de mil millones de personas en todo el mundo padecen de obesidad. Chile no queda ajeno a esta problemática, ya que según los datos de la última encuesta nacional de salud el 34.8% de la población adulta sufre de obesidad y el 75% padece de obesidad o sobrepeso (Ministerio de Salud, 2018).

Además de las cifras alarmantes, la preocupación por la obesidad radica en que representa un factor de riesgo para otras enfermedades, como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer e incluso mayor riesgo de presentar casos severos de COVID-19 (Calle et al., 2003; Field et al., 2001; Hendren et al., 2021; Kenchaiah et al., 2002).

El origen de la obesidad está influenciado por factores genéticos, epigenéticos, ambientales, conductuales e incluso socioeconómicos, los cuales desencadenan un desbalance de la homeostasis energética, debido a un aumento en la ingesta alimentaria en comparación al gasto energético

(Schwartz et al., 2017). La mantención de la homeostasis energética es un proceso dinámico y complejo que involucra la interacción de señales periféricas (como hormonas y nutrientes) con circuitos centrales que permiten regular la ingesta de alimentos (Hopkins & Blundell, 2016; Morton et al., 2014).

Cabe señalar que la conducta alimentaria no está únicamente regulada por la homeostasis energética, sino también por mecanismos hedónicos impulsados por la percepción sensorial y el sistema de recompensa. En este contexto se ha demostrado que una alimentación sabrosa, rica en calorías como lo es la dieta alta en grasas, causa una desregulación en la señalización dopaminérgica en el área tegmental ventral y el núcleo accumbens, dos áreas que componen el sistema de recompensa, y en los cuales se ha observado que el consumo de una dieta alta en causa un déficit en la recaptación de dopamina mediata por el transportador de dopamina (DAT), resultando en un aumento en la motivación y el deseo (J. J. Cone et al., 2013; Fordahl & Jones, 2017).

2. Función del núcleo arqueado en la regulación de la ingesta alimentaria.

En el contexto de la regulación de la homeostasis energética a nivel central, destaca el hipotálamo como el mayor centro regulador del balance energético y de comportamientos instintivos, tal como es el comportamiento alimenticio. El hipotálamo es una pequeña estructura cerebral ubicada en la base del diencéfalo, cercano al tercer ventrículo (3V) y en estrecho contacto con la eminencia media (EM), que está constituido por múltiples poblaciones neuronales discretas o núcleos, estrechamente conectados que participan en

la regulación del comportamiento alimentario (Jenkins, 1972). Uno de los núcleos hipotalámicos ampliamente estudiado en cuanto al comportamiento alimentario, es el núcleo arqueado (ARC), el cual tiene una ubicación estratégica adyacente al tercer ventrículo y próximo a la eminencia media, lo que le da la facultad de recibir señales de la circulación y/o del líquido cefalorraquídeo gracias a la participación de tanicitos, células ependimarias especializadas que recubren las paredes del tercer ventrículo y cuyo proceso se proyecta hacia distintas zonas del hipotálamo (Garcia et al., 2001). De esta manera, las células que componen el núcleo arqueado pueden detectar el estado nutricional del organismo, integrar señales hormonales y a partir de ello interactuar con otros núcleos hipotalámicos y extra hipotalámicos a fin de generar una respuesta coordinada del consumo de calorías y el gasto energético (R. D. Cone et al., 2001; Dhillon, 2007; Myers & Olson, 2012).

Dentro del ARC se encuentran 2 poblaciones neuronales extensamente estudiadas y con características funcionalmente antagónicas en cuanto a la ingesta alimentaria, que componen el denominado “sistema de melanocortina”. Ellas son la población de neuronas NPY/AgRP que secretan neuropéptidos orexigénicos capaces de estimular el apetito y reducir el gasto energético, como es el neuropéptido Y y la proteína relacionada con Agouti (AgRP) (Broberger et al., 1998; Hagan et al., 2000; Hahn et al., 1998). Y la población de neuronas estudiada en este trabajo de tesis, las neuronas POMC, que inhiben el apetito y aumentan el gasto energético gracias a la liberación de neuropéptidos anorexigénicos tales como la hormona liberadora de α -melanocito estimulante (α -MSH), un producto procesado de la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína

(CART) (Elias et al., 1998; Eskay et al., 1979; Kristensen et al., 1998). Lo anterior ha sido validado mediante la implementación de modernas y sofisticadas técnicas, como optogenética y farmacogenética DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*). Por ejemplo, a través de optogenéticas se demostró que, la estimulación evocada por luz de channelrhodopsin-2 en tan solo 800 neuronas AgRP, es capaz de generar una rápida y voraz alimentación en ratones, respuesta que es proporcional al número de neuronas fotoestimuladas, frecuencia y duración del estímulo (Aponte et al., 2011). De manera similar, se ha demostrado mediante el uso de DREADD que la activación de las neuronas AgRP induce dramáticamente la alimentación, reduciendo el gasto energético y en última instancia, aumentando las reservas de grasas (Krashes et al., 2011). Con respecto al funcionamiento de las neuronas POMC, la implementación de técnicas optogenéticas han permitido demostrar que la fotoestimulación de células hipotalámicas ChR2-POMC reduce, a largo plazo, la ingesta alimentaria y el peso corporal (Aponte et al., 2011). Lo mismo ha sido validado mediante DREADD, puesto que la activación específica y prolongada de neuronas POMC hipotalámicas permite la disminución de la ingesta alimentaria (Zhan et al., 2013).

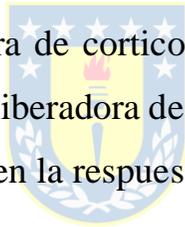
Cabe destacar que el funcionamiento de ambas poblaciones neuronales es un proceso altamente regulado y coordinado que responde al estado energético del organismo. Por ejemplo, α -MSH es un agonista de los receptores de melanocortina 3 (MC3R) y 4 (MC4R), mientras que AgRP es un agonista inverso de estos receptores, por lo que existe una competencia entre ambas moléculas por la unión al receptor (D. Lu et al., 1994). Por otra

parte, frente a un bajo nivel energético (como ocurre con el ayuno) se genera un aumento en la producción de grelina, péptido de 28 aminoácidos producido principalmente por las células oxínticas del estómago que activa a las neuronas NPY/AgRP, aumentando la liberación de estos neuropéptidos, y la liberación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) por parte de estas neuronas, y con ello incrementar la ingesta de alimentos. Por lo tanto, grelina ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de las neuronas POMC (Cowley et al., 2003; L. Wang et al., 2002). De manera opuesta, cuando los niveles energéticos están elevados, como en condiciones postprandiales, desde el tejido adiposo se secreta leptina, una hormona peptídica que mediante la unión a su receptor de membrana, LepR, despolariza y aumenta la activación de las neuronas POMC y, en consecuencia, disminuye la ingesta alimentaria (Cowley et al., 2001; Schwartz et al., 1997). Tal como ocurre con grelina, el efecto de leptina es potenciado al generar la inhibición de las neuronas NPY/AgRP (Baskin et al., 1999; Morrison et al., 2005). Otra molécula que aumenta su producción frente a niveles energéticos elevados es la hormona pancreática insulina, la cual activa a una subpoblación de neuronas POMC e inhibe a neuronas NPY/AgRP, causando en un efecto anorexigénico (Spanswick et al., 2000; Williams et al., 2010).

La acción coordinada de neuronas NPY/AgRP y de neuronas POMC es mantenida, además, por la liberación del neurotransmisor GABA por parte de las neuronas NPY/AgRP hacia las neuronas POMC, causando la inhibición de estas últimas (Cowley et al., 2001). Esto fue demostrado mediante la delección del transportador vesicular de GABA, *Vgat*, específicamente en neuronas AgRP, resultando en un ratón con fenotipo

magro y resistente al desarrollo de obesidad (Tong et al., 2008). Así también, análisis optogenéticos han demostrado que, tras un ayuno hay un aumento en la liberación de GABA desde las neuronas NPY/AgRP hacia las neuronas POMC (Atasoy et al., 2012; Dicken et al., 2015).

El funcionamiento y regulación recíproca de ambas poblaciones neuronales modulará, a su vez, la actividad de neuronas de segundo orden localizadas en otros núcleos hipotalámicos, tal como el núcleo paraventricular (PVN), considerado un centro integrador que recibe proyecciones de diferentes neuronas que contribuirán en la generación de hambre o saciedad. El PVN, a través del receptor de melanocortina 4 (MC4R), puede ser estimulado por α -MSH y estimular la secreción de oxitocina (Arletti et al., 1989; Br et al., 1991), de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (X.-Y. Lu et al., 2003), así como de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Fekete et al., 2000), que en conjunto favorecen la respuesta anorexigénica (figura 1).



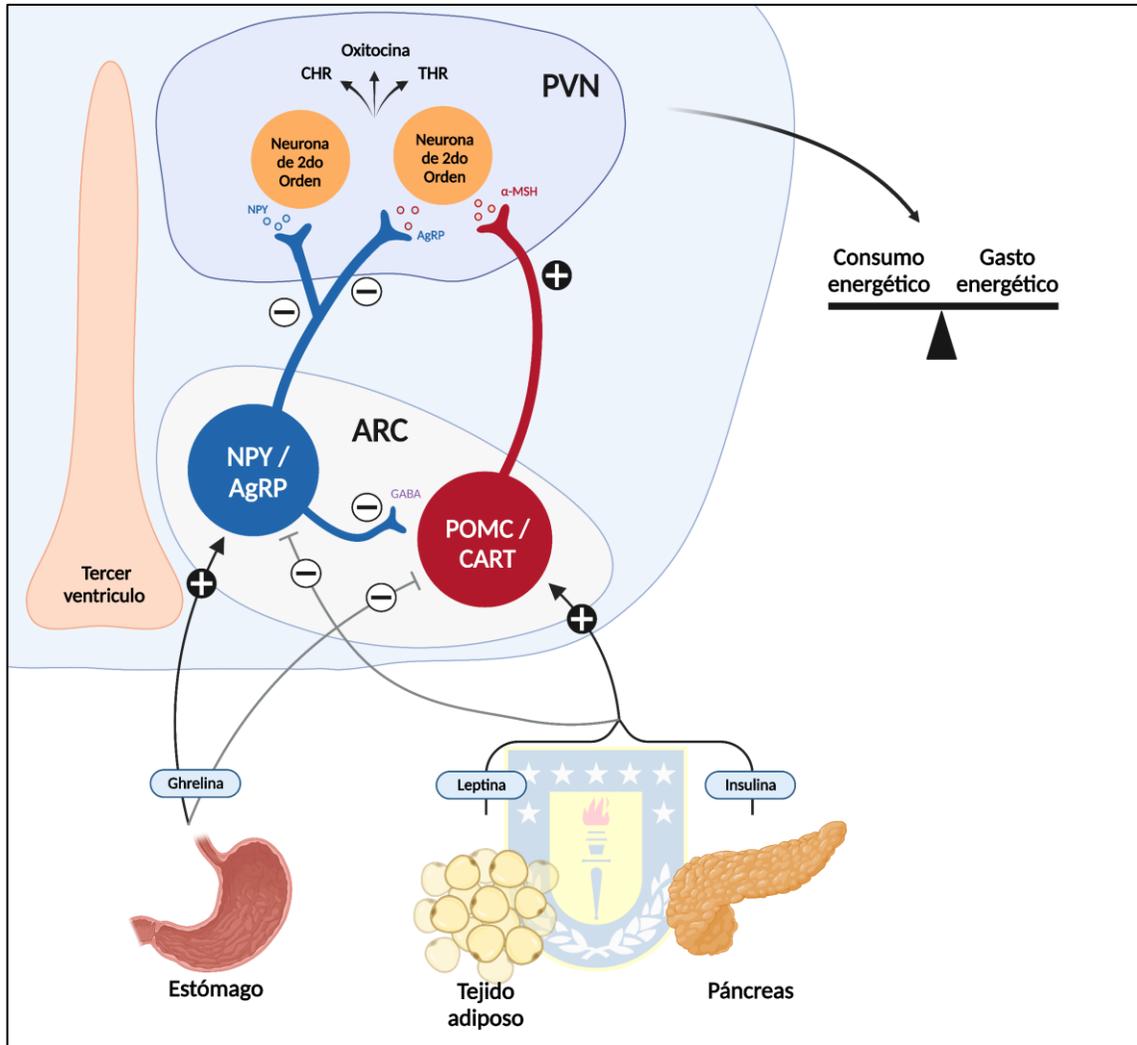


FIGURA 1: SISTEMA DE MELANOCORTINA

El sistema de melanocortina es un circuito neuronal del hipotálamo que funciona como un mecanismo sensor del estado energético. Este sistema involucra la participación de dos poblaciones neuronales funcionalmente antagónicas localizadas en el ARC; por un lado, las neuronas orexigénicas NPY/AgRP, que son activadas por ghrelina en condiciones de ayuno; y, por otro lado, las neuronas anorexigénicas POMC/CART que son activadas por leptina e insulina luego de la ingesta alimentaria. Ambas poblaciones neuronales envían proyecciones a neuronas de segundo orden en el PVN para regular la liberación de CHR, oxitocina y THR y con ello mantener el equilibrio entre el consumo y el gasto energético. En funcionamiento de neuronas NPY/AgRP y neuronas POMC/CART se encuentra

fuertemente coordinado por el efecto antagónico de las hormonas sobre ambas poblaciones, así como por la liberación de GABA desde las neuronas NPY/AgRP hacia las neuronas POMC. Signo (+) y (-) indica activación e inhibición respectivamente.

3. Procesamiento de POMC

Las neuronas POMC son un componente clave del sistema de melanocortina, que como se mencionó anteriormente, tienen un carácter anorexigénico debido a su capacidad de disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético. Este efecto anorexigénico, está dado, en parte, por el péptido α -MSH, el que es almacenado en vesículas secretoras y que es liberado frente a una estimulación de las neuronas POMC. A nivel hipotalámico, α -MSH es el producto principal que se obtiene del clivaje proteolítico de la prohormona proopiomelanocortina (POMC), una proteína de 31 kDa que se expresa en tejidos como la piel, la pituitaria y algunos órganos periféricos, donde da origen a diferentes productos dependiendo de las enzimas proteolíticas presentes, por lo que se considera que el producto resultante es tejido-específico (Eskay et al., 1979; Smith & Funder, 1988). La proteína POMC se escinde mediante convertasas prohormonales (PC), particularmente por PC1/3 y PC2, y por la enzima carboxipeptidasa E (CPE) en regiones adyacentes a aminoácidos básicos (Hook & Loh, 1984, p. 0; Pan et al., 2005, 2006). De manera que, en las neuronas POMC hipotalámicas, los productos obtenidos de la prohormona POMC será γ 3-MSH, la hormona corticotropina (ACTH), α -MSH, γ -lipotropina (γ -LPH) y β -endorfina (β -EP) (Cawley et al., 2016; Wardlaw, 2011) (figura 2).

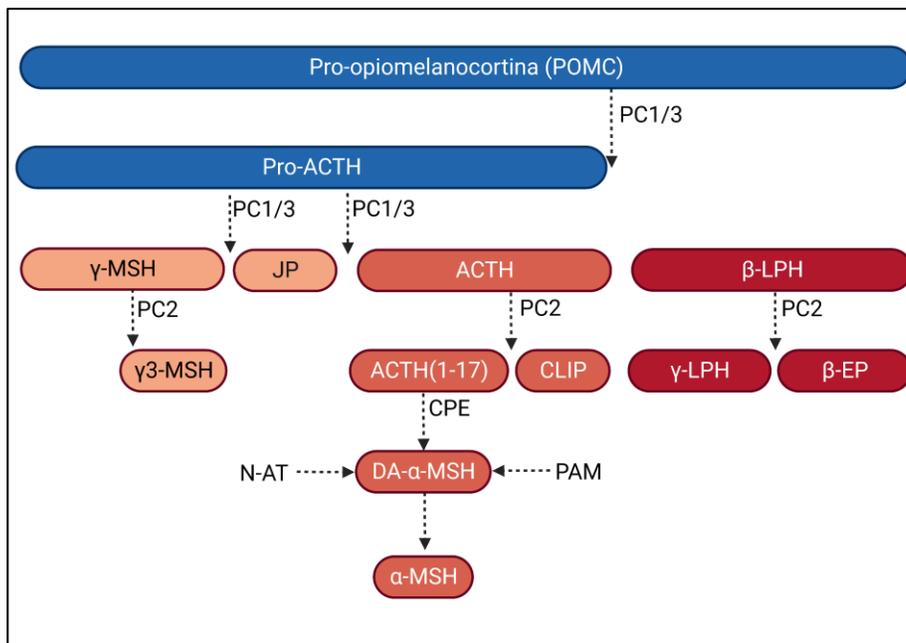


FIGURA 2: PROCESAMIENTO DE LA PROHORMONA POMC

La prohormona POMC da origen a diferentes productos debido al clivaje proteolítico efectuado por distintas enzimas. Inicialmente, la prohormona convertasa 1/3 (PC1/3) escinde secuencialmente a POMC dando origen en primera instancia a Pro-ACTH y β -lipotropina (β -LPH); y luego desde Pro-ACTH se obtiene γ -MSH, el péptido de unión (JP) y ACTH. Posteriormente actúa la enzima PC2, la cual da origen a γ 3-MSH a partir de la escisión de γ -MSH; ACTH (1-17) y el péptido intermedio similar a la corticotropina (CLIP) a partir de ACTH; así como γ -LPH y β -EP a partir de β -LPH. A continuación, y sobre ACTH (1-17), actúa la carboxipeptidasa E (CPE) cuya escisión desde el extremo carboxilo permite que la monooxigenasa amidante de peptidil-glicina α (PAM) genere una amidación y forme desacetil α -MSH (DA- α -MSH). Finalmente, DA- α -MSH es acetilado por la enzima N-acetiltransferasa (N-AT) para producir α -MSH. Representación adaptada de (Harno et al., 2018).

Como ya se mencionó, α -MSH es liberado desde las neuronas POMC hacia neuronas de segundo orden ubicadas en otros núcleos hipotalámicos y extra hipotalámicos. El ejemplo más característico de neuronas que reciben señalización de α -MSH son neuronas ubicadas en el PVN, las que poseen el receptor de melanocortina 4 (MC4R) y favorecen la respuesta anorexigénica.

Interesantemente, se ha identificado que las neuronas POMC pueden, además, tener un comportamiento orexigénico y causar un aumento en la ingesta alimenticia cuando aumenta la liberación de β -EP. La producción de β -EP está regulada por la activación del receptor de cannabinoide 1 (CB1R), presente en las mitocondrias de neuronas POMC, el cual favorece selectivamente la producción de β -EP por sobre α -MSH. La acción de β -EP, una vez liberado, involucra la estimulación de neuronas de segundo orden localizadas en el PVN (Koch et al., 2015). Este mecanismo da cuenta de la heterogeneidad existente dentro de la población de neuronas POMC (Quarta et al., 2021).

4. Efecto de la obesidad en neuronas hipotalámicas

Si bien el funcionamiento del sistema de melanocortina está altamente coordinado, existe extensa evidencia que demuestra que, frente a patologías metabólicas como la obesidad inducida por dieta, ocurre una alteración en su funcionamiento. Una de las primeras alteraciones que ocurre a nivel hipotalámico durante la obesidad es la generación de inflamación crónica de bajo grado. Este proceso inflamatorio ocurre principalmente a nivel del ARC y está caracterizado por el aumento de citoquinas proinflamatorias como

TNF- α y IL6 y genes marcadores de la vía de señalización NF- κ B (De Souza et al., 2005). Este proceso inflamatorio está acompañado, además, por la acumulación de células gliales como microglía y astrocitos que contribuyen en el aumento de citoquinas proinflamatorias. En particular, se ha identificado que tras el consumo de una dieta rica en grasas saturadas, ocurre una activación y acumulación de la microglía, acompañado de un aumento en la expresión de citoquinas pro inflamatorias (Thaler et al., 2012; Valdearcos et al., 2014). En cuanto a los astrocitos, su aumento ocasiona un incremento en la vía de señalización de IKK β /NF- κ B (Douglass et al., 2017; Sa et al., 2022; Y. Zhang et al., 2017)

Este proceso de inflamación causa un daño en la función normal de las neuronas hipotalámicas puesto que el aumento de citoquinas proinflamatorias promueve la resistencia a insulina y leptina, un fenómeno ampliamente identificado en obesidad que consiste en una disminución en la capacidad de responder a dichas hormonas, aun cuando la concentración en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo de estas hormonas se encuentra elevada (Arruda et al., 2011; Romanatto et al., 2007). Si bien, todavía no hay completa claridad sobre el nexo que existe entre inflamación y resistencia a hormonas, se ha propuesto que la activación de la vía de transducción IKK β /NF- κ B a nivel hipotalámico promueve la resistencia a insulina y leptina a través de la disminución en la activación de PIP3 y STAT3 respectivamente, dos intermediarios claves en la transducción de señales de cada hormona (X. Zhang et al., 2008). Por otro lado, se ha identificado que TNF- α induce un aumento en la expresión de PTP1B, un regulador negativo de la señalización

de ambas hormonas (Banno et al., 2010; White et al., 2009; Zabolotny et al., 2008).

Particularmente, en cuanto a la resistencia a leptina, existe evidencia sugiriendo que diversos puntos en la vía de señalización podrían verse afectados. Por ejemplo, Münzberg y colaboradores identificaron mediante inmunohistoquímica que, tras una inyección intraperitoneal de leptina, ratones obesos inducidos por el consumo de una dieta compuesta por un 58% de grasa durante 16 semanas, sufren una drástica disminución en la señal de STAT3 fosforilado (STAT3-p), en comparación con animales que reciben una dieta control, lo cual ocurre principalmente en la región donde se ubica el ARC. Asimismo, identificaron que este efecto es visible con 4 semanas de la dieta alta en grasa, periodo en que, además, ocurre un aumento (a nivel del ARC) en los niveles de ARNm del Supresor de la Señalización de Citoquinas 3 (SOCS3), un inhibidor de la fosforilación de STAT3, que por tanto altera la normal señalización de leptina (Münzberg et al., 2004). Por otro lado, la investigación de Yang y colaboradores indicó que ratones expuestos a una alimentación alta en grasa (60% de grasa) durante 5 semanas muestran un aumento en los niveles hipotalámicos de ARNm y proteína del factor de transcripción FoxO1. Además, empleando la línea celular HEK-293 con expresión estable del receptor de leptina y transfectadas con un constructo que contiene el gen de luciferasa bajo el control del promotor *Pomc*, se demostró que un aumento de FoxO1 interfiere en la actividad del promotor inducida por leptina, puesto que se une a STAT3 en el núcleo impidiendo su interacción con el promotor *Pomc*, y en consecuencia, altera su capacidad de responder a leptina (G. Yang et al., 2009). En estudios más recientes,

adicionalmente, se ha demostrado que la resistencia a la leptina puede ser causada por regulación epigenética en esta vía de señalización. Interesantemente, se determinó que el hipotálamo de ratas que reciben una dieta alta en grasa (60% de grasa) por 10 semanas, sufren hipermetilación del promotor de *Pomc* en sitios que participan en la unión del factor de transcripción Sp1, lo que imposibilita su interacción y, en consecuencia, reprime la respuesta a la señalización de leptina (figura 3) (Marco et al., 2013). Esta imposibilidad de responder a la señalización de leptina, se explicaría en base a la incapacidad de las neuronas POMC en aumentar la expresión de *Pomc* y, por ende, la secreción de α -MSH (Marco et al., 2013; Münzberg et al., 2004). Lo anterior se apoya, además, en que al utilizar un análogo de α -MSH (capaz de activar a MC4R) en ratones obesos, la respuesta anorexigénica de leptina ocurre con normalidad, evidenciando una disminución en la ingesta de alimentos y peso corporal, lo que demuestra que el sistema de melanocortina corriente a bajo de las neuronas POMC mantiene intacta su capacidad de respuesta y contribuye a la idea de que la resistencia a esta hormona se debería particularmente a un defecto en el funcionamiento de las neuronas POMC (Enriori et al., 2007; Pierroz et al., 2002).

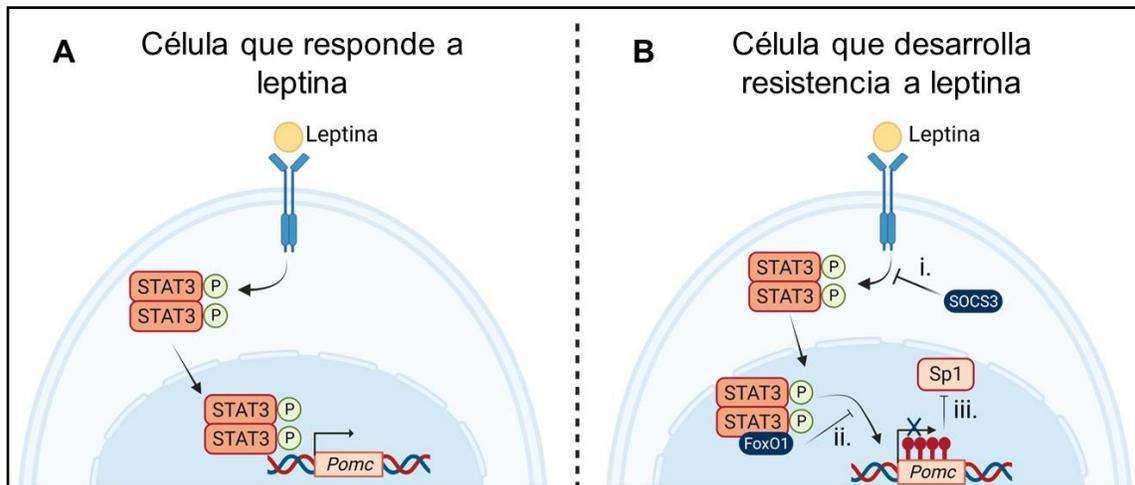


FIGURA 3: MECANISMOS MOLECULARES PROPUESTOS DE RESISTENCIA A LEPTINA EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS.

El desarrollo de obesidad conlleva a la generación de resistencia a leptina en células del hipotálamo. **(A)** En condiciones normales, la leptina se une a su receptor de membrana, lo que ocasiona la fosforilación y posterior translocación al núcleo del factor de transcripción STAT3. Una vez en el núcleo, STAT3 interacciona con el promotor de *Pomc*, y estimula su expresión génica. **(B)** Una célula resistente a leptina es incapaz de responder a esta hormona, lo cual puede deberse a una serie de mecanismos regulatorios tales como: **i.** El consumo de dieta alta en grasa causa un aumento de SOCS3, lo que inhibe la fosforilación de STAT3, por lo que no puede translocar al núcleo y ejercer su función como factor de transcripción (Münzberg et al., 2004). **ii.** El aumento en la expresión de FoxO1, causado por una dieta alta en grasa, bloquea la unión de STAT3 fosforilado con el promotor de *Pomc*, alterando la actividad del promotor (G. Yang et al., 2009). **iii.** Dietas ricas en grasa inducen una hipermetilación del promotor *Pomc* que bloquea la interacción con el factor de transcripción Sp1, y en consecuencia, genera un silenciamiento de la respuesta a leptina (Marco et al., 2013).

Otra alteración evidenciada por neuronas hipotalámicas tras la generación de obesidad inducida por dieta es el aumento del estrés del

retículo endoplasmático (RE), un efecto que contribuye tanto con la mantención de neuroinflamación como con la resistencia de leptina e insulina (Cnop et al., 2012; Williams et al., 2014; X. Zhang et al., 2008). En ese contexto, se ha determinado que el hipotálamo de ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasa presenta mayor nivel de fosforilación, y por ende activación, de PERK e IRE1, dos proteínas del RE que de manera independiente actúan como transductores del estrés del RE. Además, se ha observado que la inducción de estrés del RE en el hipotálamo de ratones controles, provoca una pérdida en la sensibilidad a leptina, puesto que la inyección intraperitoneal de esta hormona no logra incrementar los niveles de fosforilación de STAT3, así como tampoco logra disminuir la ingesta alimentaria (Ozcan et al., 2009).



Por otro lado, un proceso de degradación celular que permite mantener un balance entre la síntesis, degradación y subsecuente reciclaje de componentes celulares, es la autofagia. Este es un proceso catabólico altamente activo a nivel hipotalámico en condiciones fisiológicas (Klionsky, 2007) que, sin embargo, se ve disminuido tras el desarrollo de la obesidad inducida por dieta (Coupé et al., 2012; Meng & Cai, 2011). En particular, Coupé y cols. (2012) utilizando un modelo transgénico knock-out para el marcador de autofagia *Atg7* en células Pomc:Cre, identificaron que la disminución en la autofagia en estas células causa un aumento del peso corporal, de los depósitos de grasa epididimaria y retroperitoneal y disminuye la sensibilidad a leptina, lo que da indicios de que la integridad de la autofagia cumple un rol importante en el funcionamiento de las neuronas POMC. Sin embargo, es necesario tener precaución sobre la especificidad celular de este

modelo, puesto que se ha evidenciado que en etapas tempranas del desarrollo *Pomc* se expresa en diferentes tipos celulares permitiendo la acción de la recombinasa Cre, por lo que la delección de *Atg7* pudo no haber ocurrido únicamente en neuronas POMC y, en consecuencia, los efectos identificados en esta investigación pueden no ser específicos de esta población neuronal (Padilla et al., 2012).

Entre las alteraciones que se han evidenciado con la obesidad inducida por dieta, se encuentra también un incremento de la apoptosis a nivel hipotalámico, puesto que se determinó que ratas tratadas con una dieta compuesta por un 55% de grasa durante 8 semanas, muestran un aumento significativo en la expresión proteica de marcadores pro-apoptóticos tales como Bax, caspasa 8 y caspasa 9 (Morales et al., 2009). Es posible que este aumento en apoptosis sea la causa de la pérdida del 25% en el número de neuronas POMC, evidenciado en la investigación de Thaler y cols (2012) tras el consumo de una dieta alta en grasa por 8 semanas (Thaler et al., 2012), no obstante, todavía debe confirmarse que el aumento de apoptosis afecte en específico a las neuronas POMC.

Es importante considerar que, debido a limitaciones técnicas, la mayoría de las alteraciones previamente descritas, que ocurren durante la obesidad inducida por dieta, han sido establecidas a partir del análisis del tejido hipotalámico completo, sin tomar en cuenta la complejidad celular de este tejido, por lo que, si bien permite hipotetizar ciertos efectos, no reflejan de forma certera lo que ocurre en neuronas POMC. Con el fin de aportar en el estudio de los efectos específicos en neuronas POMC, Lyu y cols (2020) desarrollaron por primera vez, un análisis de ARN-seq a partir de neuronas

POMC purificadas desde ratones expuestos a una dieta alta en grasa (60% de grasa), encontrando que tras 8 semanas de esta dieta ocurre una profunda modulación transcripcional. Esta modulación transcripcional está caracterizada por 628 genes cuya expresión génica se encuentra aumentada y 438 que disminuyen su expresión de manera significativa en comparación a animales con dieta control. Estos genes están asociados especialmente a vías de señalización de apoptosis, ciclo celular, genes blanco de E2F, metabolismo de lípidos y señalización de quimioquinas, cuyo cambio en la expresión génica fue validada mediante qRT-PCR. A partir de estos resultados ellos proponen que la dieta alta en grasa induce una acumulación de esfingolípidos, lo que en conjunto con la activación en la señalización de quimioquinas favorece procesos inflamatorios que alteran el microambiente de las neuronas POMC; luego de lo cual ocurre una inactivación de la proteína retinoblastoma que permite la desregulación de la actividad transcripcional de E2F, culminando en una entrada aberrante al ciclo celular y posterior apoptosis de las neuronas POMC (Lyu et al., 2020). No obstante, el proceso de purificación de las neuronas POMC, se basó en la utilización del transgénico *Pomc-Cre; ROSA-tdTomato*, que genera una marca fluorescente en aquellas células que expresan la recombinasa Cre, que se encuentra bajo el control del promotor *Pomc*; como se mencionó anteriormente, el modelo *Pomc-Cre* tiene la desventaja de marcar otros tipos celulares, por lo que es posible que la expresión diferencial de ciertos genes no sea específica de las neuronas POMC.

5. Modificaciones epigenéticas

Considerando que los casos de obesidad originados por mutación en un único gen representan alrededor del 5% de los casos totales, mientras que la mayoría restante, ocurren como consecuencia de la interacción poligénica con el ambiente (Akiyama et al., 2017; Bell et al., 2005), se ha sugerido que los estilos de vida contemporáneos tales como dietas calóricas y la falta de ejercicio, pueden gatillar cambios epigenéticos que causan desregulación del balance energético y, por lo tanto, contribuyen al desarrollo de obesidad. De este modo, las modificaciones epigenéticas permiten ejemplificar cómo un cambio externo puede afectar la dinámica de expresión génica. La definición actual de epigenética es “fenotipo hereditario estable resultante de cambios en un cromosoma sin alteraciones en la secuencia de ADN” (Berger et al., 2009), que hace referencia a cambios que modifican el potencial transcripcional de una célula, que a su vez puede conducir a cambios en la función celular de una manera independiente a la secuencia de ADN y que, además, pueden ser reversibles y heredables (Goni et al., 2015). Inicialmente se creía que las modificaciones epigenéticas ocurrían únicamente en periodos tempranos del desarrollo, no obstante, actualmente se ha demostrado que continúan en un proceso activo durante la vida adulta regulando procesos adaptativos como, por ejemplo, la exposición a un ambiente con alto contenido calórico (Benite-Ribeiro et al., 2016; Roth, 2012). Clásicamente, se han definido 3 diferentes tipos de modificaciones epigenéticas que son, la metilación de ADN, modificación covalente de histonas y la regulación ejercida por ARN no codificantes. En esta ocasión, la atención estará sobre la metilación del ADN, una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en relación con la obesidad hipotalámica.

5.1 Rol de la metilación de ADN en la regulación transcripcional

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5 de un nucleótido de citosina, que en mamíferos ocurre principalmente en citosinas que están seguidas de una guanina, denominado dinucleótido CpG, los cuales son poco frecuentes en la mayoría de los eucariontes y representan cerca del 0.9-1% del genoma de humano y ratón (Al Adhami et al., 2022; de Sena Brandine & Smith, 2021). Estos dinucleótidos, tienden a agruparse para formar las denominadas islas CpG, que se caracterizan por tener un alto contenido de CpG (aproximadamente 10 veces más frecuente que el resto del genoma) y poseer una longitud entre 200 y 1000 pares de bases (Gu et al., 2011; Meissner et al., 2008).

El efecto de la metilación del ADN sobre las islas CpG, se asocia clásicamente con una represión de la expresión génica, lo cual puede ocurrir a través de dos mecanismos. En primer lugar, el grupo metilo genera un impedimento estérico que bloquea la unión de factores de transcripción; en este contexto se ha determinado que un único grupo metilo en una región de 6 pb es suficiente para impactar en el acceso de un factor de transcripción (Tate & Bird, 1993; Watt & Molloy, 1988). Otro mecanismo, por el cual la metilación del ADN inhibe la expresión es a través de la unión de proteínas con el dominio de unión a metil-CpG (también conocido como dominio MBD, por sus siglas en inglés) las cuales reclutan complejos remodeladores de cromatina junto con enzimas modificadoras de histonas, generando así su compactación y consecuente silenciamiento (Bird & Wolffe, 1999; Hashimshony et al., 2003). Además, se ha identificado una correlación inversa entre la metilación del ADN y la trimetilación de la histona 3 en la

lisina 4 (H3K4me3), una marca ampliamente definida como activadora de la transcripción (Balasubramanian et al., 2012). De este modo se ha identificado una evidente relación entre la metilación del ADN, la compactación de la cromatina y por ende la expresión génica. Por lo mismo, y tal como ocurre con la expresión génica, los patrones de metilación de ADN varían entre distintas poblaciones celulares, otorgándole un carácter célula-específico (Liu et al., 2016). No obstante, investigaciones realizadas el último tiempo han ampliado esta visión, identificando que es posible que un aumento en la metilación se relacione con un aumento en la expresión génica, lo cual se fundamenta en que factores de transcripción son capaces de unirse al ADN aun en presencia de grupos metilos (de Mendoza et al., 2022; Hu et al., 2013).

La metilación del ADN es un proceso dinámico ya que, mediante procesos enzimáticos, se puede adicionar o eliminar un grupo metilo. En particular la adición de un grupo metilo es llevado a cabo por enzimas de la familia de las metiltransferasas, entre las cuales están aquellas encargadas de adicionar un grupo metilo *de novo*, como DNMT3a y DNMT3b; y aquellas encargadas de la mantención de la metilación durante cada ciclo replicativo como DNMT1 (Hermann et al., 2004; Okano et al., 1999). Estas enzimas utilizan como sustrato un grupo metilo proveniente de la conversión de S-adenosil metionina (SAM) a S-adenosil homocisteína (SAH), ambos componentes del ciclo de la metionina que está influenciado por la presencia de nutrientes y vitaminas como folato, B12, B6 y colina (Friso et al., 2017; Mentch & Locasale, 2016). La eliminación de la metilación, en cambio, puede ocurrir de manera pasiva, mediante una ausencia de la mantención de metilación durante la replicación de ADN, así como también pueden eliminarse grupos

metilo por un mecanismo activo que requiere la participación de la familia de enzimas TET, dioxigenasas capaces de oxidar 5-metilcitosina (5-mC) a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Ambrosi et al., 2017; Bochtler et al., 2017; Iyer et al., 2009; Tahiliani et al., 2009).

Cabe mencionar que las islas CpG (principal sitio donde ocurre la metilación del ADN) pueden encontrarse en regiones regulatorias como promotores, pero también es posible encontrarlas en regiones inter e intragénicas, donde reciben el nombre de islas CpG huérfanas (Illingworth et al., 2010; Jones, 1999). Las regiones promotoras incluyen cerca del 60% del total de islas CpG en ratones, por lo que ha sido ampliamente estudiado el efecto que tiene la metilación sobre la expresión génica y ha permitido establecer que un aumento en la metilación de regiones promotoras conlleva a una disminución en la expresión del respectivo gen. Tal como se mencionó anteriormente, este fenómeno se debe a la incapacidad de establecer la maquinaria de la transcripción, ya sea por un impedimento estérico o por compactación de la cromatina (Al Adhami et al., 2022; Venolia & Gartler, 1983).

En cuanto a la metilación del ADN en islas CpG huérfanas, su estudio es bastante reciente y se ha identificado que son más propensas a encontrarse metiladas y además presentan un patrón de metilación tejido específico (Deaton et al., 2011; Illingworth et al., 2010). Si bien aún no existe total claridad de su rol, se ha sugerido que la metilación del ADN en estas regiones favorecería la expresión génica, debido a su capacidad de silenciar promotores alternativos, para mantener la eficiencia de la transcripción de su respectivo gen (Maunakea et al., 2010; X. Yang et al., 2014). Además, se ha

postulado que pueden regular los procesos de splicing alternativo (Cain et al., 2022; Nanavaty et al., 2020; Shukla et al., 2011).

Para estudiar el estado de metilación del ADN a escala genómica (también conocido como metiloma), es común utilizar la secuenciación de bisulfito (BS-seq). Esta técnica se basa en el tratamiento del ADN con bisulfito, que conduce a la transformación de citosinas no metiladas en uracilo, a través de un proceso que incluye una reacción de sulfonación, deaminación hidrolítica y desulfonación (figura 4). Los uracilos resultantes, por medio de un proceso de amplificación, son posteriormente transformados a timina, lo que permite hacer la distinción entre citosinas metiladas y no metiladas (Cokus et al., 2008; Frommer et al., 1992). La secuenciación con bisulfito puede aplicarse a todo el genoma a resolución de un único nucleótido (técnica conocida como *Whole genome bisulfite sequencing*, WGBS por sus siglas en inglés) sin embargo, esta técnica resulta bastante costosa en términos de secuenciación (Lister et al., 2009). Como solución, y teniendo en consideración que las islas CpG constituyen un pequeño porcentaje del genoma, se han desarrollado estrategias como la Secuenciación de bisulfito de representación reducida (RRBS por sus siglas en inglés), que tiene la cualidad de enriquecer la secuenciación de regiones ricas en CpG, debido a que incluye la utilización de la enzima de restricción MspI que reconoce y corta sitios CCGG (Gu et al., 2011; Meissner et al., 2005, 2008). De esta manera, la técnica RRBS tiene la ventaja de entregar resultados a resolución de un único nucleótido con una alta eficiencia y un bajo costo.

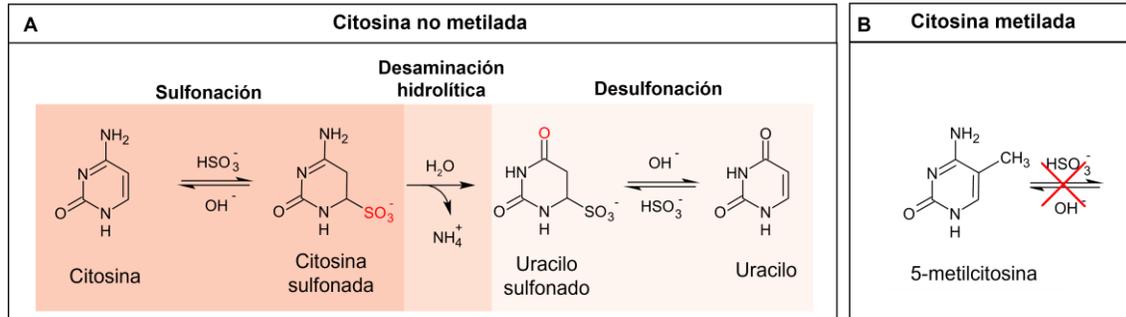


FIGURA 4: REACCIÓN DE CONVERSIÓN DEL BISULFITO

(A) Mediante una reacción de sulfonación, la citosina es capaz de reaccionar con el bisulfito y dar origen a una citosina sulfonada. A continuación, la citosina sulfonada sufre una desaminación hidrolítica que da lugar uracilo sulfonado. El uracilo sulfonado, posteriormente, se transforma en uracilo mediante una reacción de desulfonación. (B) El grupo metilo de la 5-metilcitosina impide la reacción del bisulfito.



5.2 Metilación de ADN en neuronas POMC

Dado que la regulación ejercida por la metilación del ADN es estable en el tiempo, fue considerada por mucho tiempo como un proceso exclusivo de etapas tempranas del desarrollo como por ejemplo en la inactivación del cromosoma X. No obstante, en la actualidad es aceptado que la metilación del ADN es un proceso dinámico que se mantiene en la vida adulta, que puede ser modificado durante distintas enfermedades y regulado por condiciones ambientales, como el tipo de dieta (Alegría-Torres et al., 2011; Mattocks et al., 2017). Lo anterior parece ser particularmente importante a nivel cerebral, donde neuronas post-mitóticas muestran una elevada expresión de DNMT1 y DNMT3a, mientras que su ausencia causa alteraciones en la plasticidad neuronal (Feng et al., 2010). Además de la metilación del ADN

(5-mC), la hidroximetilación (5-hmC) también parece cumplir un rol importante en el sistema nervioso central, puesto que se encuentra particularmente enriquecido en este tejido, donde es capaz de interactuar con proteínas de la familia MBD y, al parecer, ejercería una función estimuladora de la expresión génica (Globisch et al., 2010; Shen et al., 2020).

En relación con el control de la homeostasis energética a nivel hipotalámico, existen diferentes investigaciones que han permitido establecer que la metilación del ADN juega un rol importante en su regulación. Evidencia de ello fue obtenida al observar que animales transgénicos que carecen de DNMT3a en neuronas *Sim1* del núcleo paraventricular desarrollan obesidad, hiperfagia, disminución del gasto energético y niveles plasmáticos elevados de leptina e insulina (Kohn et al., 2014).

Adicionalmente, el tipo de dieta ingerida puede modificar el estado de metilación de diferentes genes durante la vida adulta. Por ejemplo, ratones que reciben una dieta de cafetería (rica en grasa y azúcares) muestran una variación en la expresión de neuropéptidos hipotalámicos, particularmente, se evidencia un aumento en la expresión de *Pomc* en el núcleo arqueado y de *Npy* en el núcleo paraventricular. Estos cambios en la expresión génica están acompañados, además, por una disminución en la metilación del promotor de ambos genes (Lazzarino et al., 2017). Por otro lado, y tal como se mencionó anteriormente, un estudio realizado por Marco y cols. (2013) mostró que ratas alimentadas con una dieta alta en grasa tienen mayores niveles plasmáticos de leptina e insulina en relación con ratas alimentadas con dieta control como cabía esperar, sin embargo, no hay variación en los niveles de expresión de *Pomc* a nivel hipotalámico. Junto con esto, se observó que la región

promotora de *Pomc* se encuentra hipermetilada en sitios particularmente relevantes para la unión del factor de transcripción Sp1 (Marco et al., 2013). En otra investigación desarrollada en ratones se identificó que, tras una inflamación aguda, la subunidad RELA del NF- κ B es capaz de unirse a la región promotora de *Pomc* y promover su transcripción, sin embargo, con una inflamación crónica inducida por el consumo de una dieta alta en grasas por 20 semanas ocurre un aumento significativo en el estado de metilación del promotor *Pomc*, específicamente en una citosina que participa en la unión con RELA, impidiendo que esta pueda activar la transcripción de *Pomc* (Shi et al., 2013).

Estos hallazgos hacen sugerir que la modificación en el nivel de metilación y el consecuente cambio en la expresión génica inducido por la dieta, podría extenderse a otros genes y con ello contribuir en el fenotipo que muestran las neuronas POMC durante la obesidad. Lo anterior, sumado a la escasa información que se tiene sobre las alteraciones que afectan específicamente a las neuronas POMC durante el desarrollo de obesidad, así como el carácter célula-específico de la metilación del ADN, junto con la ausencia hasta la fecha de estudios que hayan explorado la metilación del ADN a escala genómica en esta población celular purificada, es que el presente trabajo busca analizar modificaciones en el metiloma que puedan ocurrir específicamente en las neuronas POMC y que contribuyan al desarrollo y mantención del fenotipo que exhiben estas células durante la obesidad inducida por dieta.

II. HIPOTESIS

Estudios previos, en individuos que sufren obesidad, han demostrado diversas alteraciones en el normal funcionamiento de las neuronas hipotalámicas POMC, por lo que su capacidad de inhibir el apetito se encuentra afectada.

Entre estas alteraciones se evidencia un aumento de procesos neuroinflamatorios, resistencia a hormonas y estrés del retículo endoplasmático; disminución de la autofagia, pérdida del cilio primario, disminución de la excitabilidad neuronal y cambios en la dinámica de expresión génica.

Un mecanismo molecular que podría estar involucrado en el desarrollo y/o mantención de estas alteraciones es la metilación del ADN, puesto que tiene la capacidad de regular la expresión génica y está fuertemente influenciada por factores ambientales como la exposición a dietas calóricas.

En vista de lo anterior, surge la interrogante ¿Es la obesidad inducida por una dieta alta en grasa capaz de generar cambios en el metiloma y en transcriptoma de las neuronas POMC? Frente a lo cual se propone la siguiente hipótesis:

La obesidad inducida por una dieta alta en grasas induce dinámicas de metilación y expresión de neuronas POMC en genes implicados en el desarrollo de obesidad.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la modulación en el metiloma de las neuronas POMC producto de la obesidad inducida por dieta.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el metiloma de neuronas POMC obtenidas desde ratones obesos inducidos por dieta y ratones controles.
2. Relacionar los cambios en el metiloma de las neuronas POMC con los cambios en el transcriptoma de neuronas POMC de ratones sometidos al mismo tratamiento.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aprobación bioética del diseño experimental y manejo de animales

Los procedimientos que involucran trabajo con animales fueron revisados y aprobados por el comité de Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción y por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEBB 531-2019, en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación N°11190401). Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, Centro Regional de Estudios Avanzados para la Vida (CREAV), siguiendo las directrices del Instituto Nacional de Salud para el cuidado y uso de los animales, y con una revisión permanente de los aspectos físicos y conductuales de los animales por parte de profesionales veterinarios. Además, los animales se alojaron en grupos de 3 a 5 animales por jaula, a una temperatura promedio de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y con agua y comida *ad libitum*.

2. Generación de animales obesos inducidos por una dieta alta en grasas.

Se utilizó la línea transgénica de ratones C57BL/6J-Tg(Pomc-EGFP)1Low/J (JAX cepa #009593) (Cowley et al., 2001). A las 8 semanas de edad, 44 machos fueron divididos en dos grupos. El grupo control (CD) que recibió una dieta control (D5053, LabDiet) y el grupo experimental recibió una dieta alta en grasa saturada (HFD, 60% grasa, D12492, Research Diet) (figura 5). La composición en kcal de la dieta alta en grasa es: 20% proteína, 20% carbohidratos y 60% de grasa. Esta intervención alimentaria tuvo una duración de 11 semanas, periodo durante el cual se midió semanalmente el peso corporal y se calculó la ganancia de peso; definida como la diferencia

entre el peso corporal de cada semana versus el peso corporal al inicio de la intervención alimentaria. Asimismo, tres días a la semana se midió la ingesta de alimento por jaula. Los gramos de alimento medidos luego fueron transformados a kcal, para lo cual se consideró una equivalencia de 3.1 kcal/g para la dieta control y 5.2 kcal/g para la dieta alta en grasa (LabDiet, 2023; Research Diets, Inc., 2023). Asumiendo que todos los animales consumen cantidades similares de alimento se calculó la ingesta calórica diaria por animal.

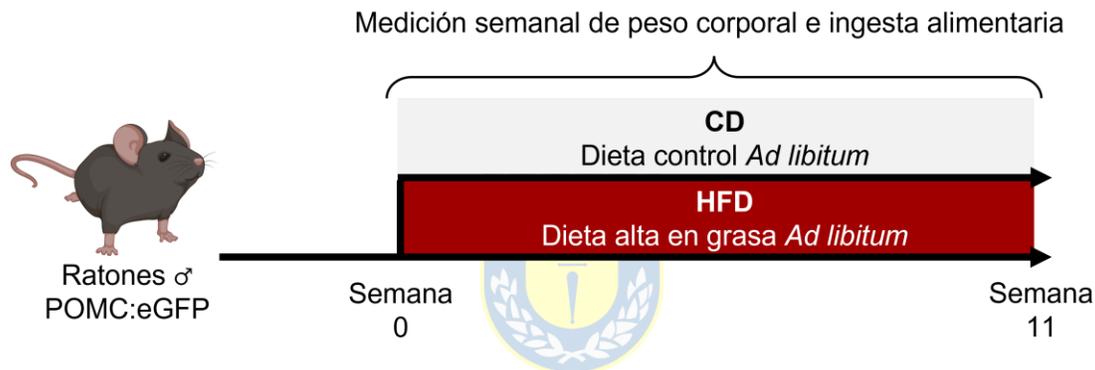


FIGURA 5. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA GENERAR ANIMALES OBESOS INDUCIDOS POR DIETA HFD

Ratones de 8 semanas de edad fueron divididos en 2 grupos, CD y HFD. A continuación, y por 11 semanas, el grupo HFD recibió una dieta alta en grasa, mientras que el grupo CD continuo con la dieta control, ambas *ad libitum*. Durante este periodo se midió semanalmente del peso corporal e ingesta alimentaria.

2.1 Medición de glicemia y perfil lipídico

A fin de evaluar cambios en la glicemia asociados con el tratamiento de la dieta alta en grasa, se midió la concentración de glucosa en sangre al momento de ingresar al experimento y luego de las 11 semanas de la

intervención dietaria. Para esto, los animales fueron sometidos a un ayuno nocturno de 12 horas y se realizó una punción a la vena caudal de la cola para extraer sangre y medir glicemia con un glucómetro *Accu-chek Guide* (Roche). Junto con la medición de glicemia, se colectó muestra sanguínea la cual se mantuvo con heparina (20UI por mL de sangre) para evitar su coagulación y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. De esta manera se aisló el plasma y se almacenó a -80°C para análisis posteriores.

Desde las muestras de plasma, se realizó un perfil lipídico, mediante espectrofotometría, para determinar las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos y HDL. A partir de estos 3 valores se calculó la concentración plasmática de LDL, siguiendo la fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972). Estas mediciones fueron realizadas como servicio externo en el laboratorio clínico a cargo del Dr. Luis Briceño.

Cabe señalar que tanto la medición de glicemia al inicio del experimento, como la medición del perfil lipídico se realizó sobre un subgrupo aleatorio del total de animales.

3. Purificación de neuronas POMC por medio de la técnica FACS

Una vez terminado el periodo de 11 semanas, los animales fueron anestesiados en una cámara de inhalación con un flujo constante de isofluorano (1mg/ml, 4% de isofluorano) para luego ser sacrificados por dislocación cervical y decapitación. Posteriormente, se extrajo el cerebro completo, se mantuvo en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS 1X, Gibco) y se microdisectó la región hipotalámica medio basal bajo

lupa de epifluorescencia (Olympus MVX10) en base a la fluorescencia emitida por el transgén POMC:eGFP. Dado que disgregar neuronas hipotalámicas de ratones adultos manteniendo la viabilidad celular es un proceso complejo, fue necesario estandarizar un protocolo eficiente para esta tarea (figura 6). Para ello se utilizó una mezcla enzimática de papaína (50 U/mL, Sigma, USA) y tripsina (0.12%, Sigma, USA). La solución enzimática fue preparada en tampón HBSS con rojo fenol (Gibco), EDTA 100mM, L-cisteína 99.9% %p/p y trehalosa 50% %p/v a pH 7 (regulado con NaOH). Se utilizaron 300µL de la solución enzimática para un conjunto de 3-5 hipotálamos por muestra y fueron incubados por 10 minutos a 37°C. Luego, se adicionaron 2 µL de DNase I (1 U/µl, Invitrogen) y se realizó una disgregación mecánica con una micropipeta p1000, para ser incubados nuevamente a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, se continuó con la disgregación mecánica con una micropipeta p200 con punta abierta (se considera una punta abierta porque se cortó aproximadamente 1mm desde el extremo de la punta), seguido de suspensiones con una micropipeta p200 sin cortar, hasta no tener tejido visible. Una vez que todo el tejido fue disgregado, se adicionó 500µL de una solución de detención (10% de suero bovino fetal (SBF), trehalosa 50% %p/v, HBSS con rojo fenol y NaOH 10% para mantener un pH = 7) para disminuir la actividad de las enzimas proteolíticas. La suspensión celular fue, posteriormente, filtrada a través de un filtro celular de 70µm y centrifugada a 700g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 500 µL de una solución FACS que contiene DPBS suplementado con BSA al 0.5%, trehalosa 50% p/v, EDTA 100mM y DNase I (1 U/µl, Invitrogen). Finalmente, la suspensión celular fue nuevamente filtrada con un filtro de 70µm en un tubo de 1.5mL de baja

retención (Cat. 72.706.700, Sarstedt). Este procedimiento se realizó de manera paralela con una muestra obtenida de un animal no transgénico, que actuó como control negativo para establecer el umbral de fluorescencia basal del citómetro.

La suspensión conteniendo las células disgregadas (tanto del control negativo como de la muestra POMC:eGFP) fue sometida a una selección de células activada por fluorescencia (FACS, del inglés *fluorescence-activating cell sorting*). El FACS se llevó a cabo en el centro de microscopia avanzada (CMA, Universidad de Concepción) utilizando el equipo FACS Aria-III, BD Biosciences e identificando la señal de GFP con el detector FITC. La clasificación de células se estableció en modo enriquecimiento y de manera jerárquica, a partir de la relación entre *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC) que reflejan el tamaño y granularidad celular, respectivamente. Luego se estableció la eliminación de dobletes a partir de la relación entre *side scatter area* (SSC-A) y *side scatter height* (SSC-H). Adicionalmente, y a partir del control negativo se definió un valor umbral de intensidad de FITC para delimitar cuando un evento se considera positivo. Este parámetro se define en cada ensayo a partir del control negativo y en promedio se definió alrededor del valor 10^3 unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los eventos positivos fueron recolectados en un tubo de 1.5mL de baja retención (Cat. 72.706.700, Sarstedt) que contenía tampón de lisis, proteinasa K y carrier de ARN del *kit QIAamp® DNA Micro kit* (Cat. 56304, Qiagen).

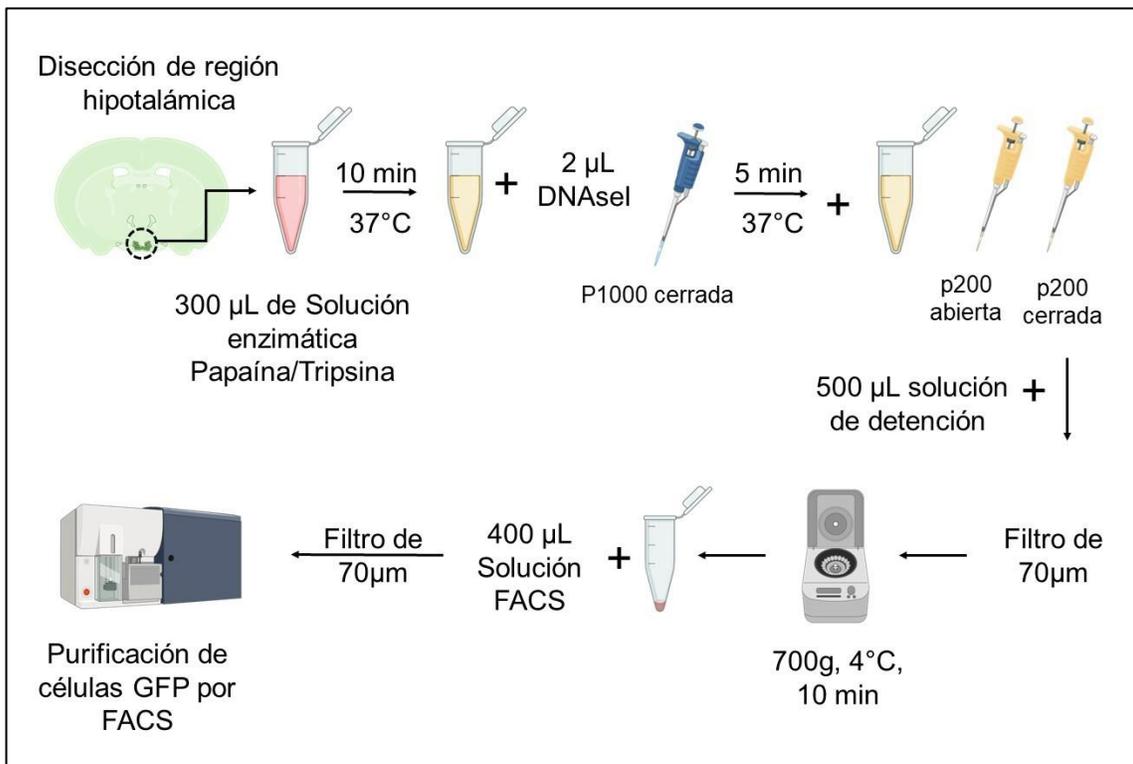


FIGURA 6: PROTOCOLO DE DISGREGACIÓN DE CÉLULAS HIPOTALÁMICAS

A partir del cerebro completo de animales transgénicos POMC:eGFP se microdisectó la región hipotalámica medio basal. Este tejido se sumergió en 300 µL de una solución enzimática de Papaína y Tripsina y se incubó por 10 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionaron 2 µL de DNase I y se realizó una disgregación mecánica con una micropipeta p1000, luego de lo cual fue nuevamente incubado por 5 minutos a 37°C. Posterior a la incubación se prosigió con la disgregación mecánica, esta vez, utilizando una micropipeta p200 con la punta abierta y luego con una cerrada, hasta que no haya tejido visible. Luego, se adicionaron 500 µL de una solución de detención, que disminuye la reacción de las enzimas proteolíticas, se filtró a mediante un filtro celular de 70 µm y se centrifugó a 700g por 10 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 400 µL de una solución FACS y se realizó un segundo proceso de filtración, con un filtro celular de 70 µm. Finalmente, la suspensión celular fue sometida a FACS a fin de purificar las células GFP.

4. Extracción y medición de concentración de ADN genómico

A partir de las células GFP positivas previamente sorteadas, se procedió a extraer el ADN genómico con el kit *QIAamp® DNA Micro* (Cat. 56304, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, con una elución final de 20 µL. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN genómico con el equipo Qubit Fluorometer4 y el kit *Qubit dsDNA HS Assay* (Cat. Q32851, Thermo Fisher), que cuantifica en base a la fluorescencia emitida por un colorante que se une selectivamente al ADN doble hebra. Esta última medición se realizó en Melisa Institute (San Pedro de la Paz, Concepción, Chile). Debido a que se obtuvieron bajos valores de concentración para muestras individuales, se decidió mezclar dos o más muestras hasta alcanzar una cantidad mínima de 15ng de ADN genómico.

5. Secuenciación del metiloma de neuronas POMC

Hacer compatible la muestra en estudio con la plataforma de secuenciación, se conoce como preparación de librería, proceso que tiene como base la ligación de adaptadores para permitir la unión de la muestra a la celda de flujo del equipo de secuenciación. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó el kit *Zymo-Seq RRBS™ Library Kit* (D5460, Zymo Research), para 2 muestras de la condición CD y 2 muestras de la condición HFD. Cada muestra contenía aproximadamente 15 ng de ADN genómico los cuales fueron digeridos con la enzima de restricción Msp1. Luego, se realizó la ligación de adaptadores y reparación de las hebras por medio de la incorporación de nucleótidos. Posteriormente, se realizó la conversión con bisulfito y finalmente una amplificación por PCR de la librería incorporando un index en un extremo de cada fragmento. Un index es una secuencia de

oligonucleótidos que actúan como adaptadores en el proceso de secuenciación y que son propiedad intelectual de Illumina Inc. La amplificación por PCR incluyó 15 ciclos, que es el número recomendado por el fabricante en base a la cantidad de ADN genómico con la cual se comenzó. Cabe mencionar que las secuencias index permiten diferenciar cada una de las 7 muestras durante el proceso de secuenciación, por lo que es necesario utilizar un index diferente en cada muestra. El index utilizado para cada muestra en la tabla 1.

TABLA 1. SET DE INDEX UTILIZADOS PARA CADA MUESTRA

Muestra	Index primer set	Secuencia
CD 1	Index F	CTTGTA
CD 2	Index G	ATCACG
HFD 1	Index I	ACTTGA
HFD 2	Index J	GATCAG

Posteriormente, se realizó una electroforesis capilar con el fin de determinar la distribución de tamaño de los fragmentos que componen la librería, puesto que la exposición a un campo eléctrico genera una migración diferencial que es proporcional al tamaño de cada fragmento. Para ello se utilizó el kit *High Sensitivity Kilo Base Cartridge Kit* (C105253, Bioptic) y el equipo Qsep₁₀₀ (Bioptic) en Melisa Institute (San Pedro de la Paz, Concepción, Chile). Además, se cuantificó la concentración por Qubit y se realizó una estimación de la concentración molar de las librerías utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{Concentración (ng/}\mu\text{L)}}{660 \times \text{tamaño de librería (bp)}} \times 10^6$$

Formula N° 1: Cálculo de concentración molar

Finalmente, la secuenciación se realizó por medio de un servicio externo utilizando un secuenciador Illumina NovaSEQ 6000, en el centro de investigación GIGA (Universidad de Liege, Bélgica), en modo *paired-end* y con una profundidad de 30 millones de secuencias por librería.

6. Análisis bioinformático, control de calidad de los datos

Los datos crudos, obtenidos desde la secuenciación, fueron sometidos a un análisis de calidad mediante el programa *FastQC* (v0.11.9) (Andrews, 2010) (Anexo 1). Se examinó la calidad de secuenciación por cada base (valor phred), la proporción de bases a lo largo de la secuencia, la contaminación de adaptadores y la longitud de las secuencias. Cabe considerar que el valor phred es una métrica de la calidad con que se identificó cada base, que se define como la probabilidad logarítmica de que una base sea mal identificada por el secuenciador; cuando se alcanza un valor phred de 30, la probabilidad de que la identificación sea incorrecta es de 1 en 1000 y por tanto la exactitud es de 99,9% (Ewing & Green, 1998).

En base a los resultados de calidad, se realizó un procesamiento de los datos con el programa *TrimGalore* (v0.6.7) (Krueger, 2016) para remover bases en los extremos con calidad phred inferior a 24, bases no determinadas (N), adaptadores y los nucleótidos incorporados en la reparación de las hebras durante la preparación de la librería. Asimismo, se eliminaron las secuencias que tenían una longitud menor a 50 pares de bases. Una vez realizado el

procesamiento, se evaluó nuevamente la calidad de los datos con el programa *FastQC* (Anexo 2).

Como análisis adicional para evaluar la calidad de los datos y corroborar que provengan de muestras de ratón, se realizó un alineamiento de las secuencias al genoma de 8 organismos modelos: *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y *E. coli*. Para esto se utilizó el programa *FastQ-Screen* (v0.15.1) (Wingett, 2011) con la configuración *--bisulfite* para indicar que las secuencias fueron tratadas con bisulfito. Cabe señalar que los index de los organismos modelos fueron descargados directamente por *FastQ-Screen* desde el sitio web de Babraham Bioinformatics con el comando *--get_genomes* (Anexo 3).

6.2 Alineamiento al genoma de referencia e identificación del estado de metilación

Con el objeto de identificar desde qué región genómica proviene cada una de las secuencias, se realizó un alineamiento de los datos procesados al genoma de ratón GRCm39 (versión 108, Ensembl), para lo cual se utilizó el programa *Bismark* (v0.24.0) (Krueger & Andrews, 2011). Cabe señalar que previo a la ejecución del alineamiento, fue necesario realizar una preparación de la referencia, con el comando *bismark_genome_preparation* en el cual el genoma se somete a una conversión de C → T y de G → A. El costo computacional asociado a este proceso (y al alineamiento propiamente tal) es elevado, más aún cuando se trabaja con genomas extensos como el de ratón, que pueden llegar a requerir más de 128 GB de memoria RAM. Por esta razón, se trabajó únicamente con las secuencias cromosomales del genoma de referencia (Anexo 4).

Con el fin de obtener mayor eficiencia de alineamiento, es decir, mayor número de alineamientos únicos, se utilizaron 4 diferentes configuraciones (tabla 2) (Anexo 5). El alineamiento no direccional (realizado con el comando *--non_directional*) implica que cada secuencia puede provenir de 4 posibles hebras (hebra sentido original, hebra sentido complementaria, hebra antisentido original y hebra antisentido complementaria) y se define por el protocolo de preparación de librería (anexo 5b). En cuanto a la disminución de la exigencia, se aumentó el máximo mismatch permitido para considerar un alineamiento como válido (mediante el comando *--score_min L,0,-0.6*) (anexo 5c). El alineamiento local (ejecutado con el comando *-local*) modifica el modo de alineamiento de global a local (anexo 5d). Todos estos parámetros son comúnmente testeados cuando se tiene una baja eficiencia de alineamiento (Krueger, 2015/2023). Cabe señalar que para este análisis se utilizó únicamente la muestra CD1.

TABLA 2. TESTEO DE DIFERENTES PARÁMETROS DE ALINEAMIENTO

Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Alineamiento por defecto	Alineamiento no direccional	Alineamiento no direccional	Alineamiento no direccional
		Disminución de exigencia	Disminución de exigencia
			Alineamiento local

De acuerdo con la eficiencia de mapeo resultante, se seleccionó el test 3 y se procedió a ejecutar el alineamiento para todas las muestras. Como resultado, *Bismark* entrega un reporte con la eficiencia de mapeo, la cantidad de secuencias que no alinean bajo ninguna condición y la cantidad de secuencias que alinean en más de una posición del genoma (alineamiento ambiguo).

A continuación, se realizó la determinación del estado de metilación de cada citosina en contexto CpG, CHG y CHH (donde H puede ser A, T o C) utilizando la función *bismark_methylation_extractor* incluida en *Bismark* y extrayendo únicamente la información en contexto CpG (Anexo 6). La ejecución de esta función genera un archivo *coverage* que informa el cromosoma del que proviene cada citosina, la coordenada genómica, el porcentaje de metilación y la cantidad de veces que se encontró una determinada citosina metilada y sin metilar. A partir de estos archivos se visualizó, en cada una de las muestras, el estado de metilación de la región genómica correspondiente al gen *Pomc* mediante el visualizador IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2013), para lo cual se utilizó la anotación del genoma y de las islas CpG de ratón (mm10, USCS). Posteriormente se exploró la ubicación citosinas metiladas (mC) por estructura génica, vale decir, distinguir mC localizadas en promotores, intrones, exones o regiones intergénicas. Lo anterior se llevó a cabo utilizando la anotación de ratón GRCm39 (versión 107, Ensembl) y la función *annotateWithGeneParts* de *Methylkit* (v1.24.0) (Akalín et al., 2012).

Adicionalmente, se exploró el estado de metilación de citosinas ubicadas en una región promotora arbitrariamente definida, que abarca 2kb corriente arriba y corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus

siglas en ingles) de todos los genes activos en neuronas POMC, considerando como genes activos aquellos que se expresan en estas neuronas. Para esto, se construyó una matriz de conteo con la función *computeMatrix* de *DeepTools* (Ramírez et al., 2016), la cual contiene información del puntaje de metilación en esta región promotora. A partir de esta matriz se construyó un mapa de calor con el puntaje de metilación de citosinas en cada gen, ordenado de manera descendente, mediante la función *plotHeatmap* de *DeepTools*. A fin de evaluar si el estado de metilación de citosinas en la región promotora está relacionado con la expresión génica, se graficó la abundancia de ARN de cada uno de los genes activos, ordenados de manera descendente según su puntuación de metilación. Para esto se utilizaron datos de ARN-seq generados en nuestro laboratorio siguiendo el mismo protocolo de alimentación de animales y purificación de neuronas (datos no publicados). Lo anterior se realizó de manera independiente para muestras de la condición CD y HFD.

6.3 Análisis de metilación diferencial

Con el objetivo de analizar si la obesidad genera cambios en los patrones de metilación del ADN en las neuronas POMC, se procedió a realizar un test de metilación diferencial entre las muestras provenientes de ratones obesos y ratones controles. Para ello se utilizó el programa R (v4.2.1), con el paquete *MethylKit* que permite calcular estadística descriptiva de los patrones de metilación del ADN, medir la similaridad entre las muestras y calcular un test de metilación diferencial (Anexo 7).

En la medición de estadística descriptiva se calculó, para cada muestra individual, la cobertura de cada citosina y a partir de ello se construyó un

histograma con la frecuencia de coberturas (función *getCoverageStats*, anexo 7). De esta manera, si se encuentra que hay citosinas que tienen una cobertura notoriamente mayor que el resto, se puede establecer que el experimento sufrió sesgo de PCR, lo que implica que ocurrió una amplificación asimétrica de algunas secuencias y, en consecuencia, afecta la determinación precisa del porcentaje de metilación. Como consecuencia de este análisis se decidió aplicar un filtro (de manera independiente para cada muestra) para descartar bases que tengan una cobertura percentil mayor a 99.9 y menor a 10X (función *filterByCoverage*, anexo 7). Posterior al filtro, se normalizó la distribución de cobertura entre las muestras (función *normalizeCoverage*, anexo 7) y se construyó una matriz que incluye solo aquellas citosinas cubiertas en todas las muestras, la cual será utilizada para los siguientes análisis.



Por otro lado, la similaridad en los perfiles de metilación entre las muestras fue explorada a través de coeficientes de correlación de pares, calculado con el método de Pearson; y un análisis de componente principal (PCA del inglés *Principal Components Analysis*) (función *clusterSamples* y *PCASamples*, respectivamente. Anexo 7). Este último, es una técnica de transformación lineal no supervisada, que permite simplificar la multidimensionalidad de los datos (derivada de la cantidad de citosinas y las secuencias asociadas a cada una de ellas) a través de una correlación entre varianzas, a un plano simple de dos dimensiones. El componente principal 1 (PC1) es el que exhibe la mayor varianza posible, y a partir del cual se calcula el componente principal 2 (PC2) (Lever et al., 2017).

Posteriormente, ejecutando el comando *calculateDiffMeth* se realizó el test de metilación diferencial, que mediante una regresión logística compara la fracción de citosinas metiladas entre el grupo control y experimental. De manera simultánea al test estadístico, y a fin de corregir el problema de la prueba de hipótesis múltiple, se realizó una corrección del valor p mediante el modelo SLIM a partir del cual se obtiene el valor q, que refleja la significancia. Este procedimiento se realizó a resolución de una única citosina, identificando como citosinas diferencialmente metiladas (DMC del inglés *Differential Methylated Cytosines*) aquellas con una significancia menor o igual a 0.05 y una diferencia de metilación entre ambas condiciones de un 25%. Cabe señalar que, dentro de la metilación diferencial, se define hipermetilación cuando la metilación es significativamente mayor en el grupo experimental en comparación al control, e hipometilación cuando la metilación es significativamente menor. Adicionalmente, se exploró el comportamiento de las DMC por cada cromosoma y por estructura génica. Así también, se asoció cada DMC a su respectivo gen mediante la función *getAssociationWithTSS* (anexo 7).

6.4. Asociación entre metilación de ADN y expresión génica

A fin de evaluar si la metilación diferencial que ocurre como consecuencia de la obesidad, particularmente en las cercanías de la región promotora, está relacionada con un cambio en la expresión génica se correlacionaron los datos de metilación de ADN con datos de expresión génica generados por nuestro laboratorio mediante ARN-seq (datos no publicados). Para ello se extrajo la información de metilación de todas las citosinas contenidas en la región promotora previamente definida (ventana genómica de 2kb alrededor

del TSS) referente al porcentaje de cambio de metilación y su significancia; y posteriormente, se asoció con la información de expresión de su respectivo gen. Cabe señalar que la variación en la expresión génica se define por el logaritmo en base 2 de las veces de cambio de abundancia de ARN (\log_2FC , por sus siglas en inglés) y la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés); el primer término define si hay un aumento o disminución en la expresión y el segundo término define la significancia de este cambio. En este caso, se estableció un valor de FDR menor o igual a 0.1 para definir una variación significativa en la expresión génica.

A continuación, y con el objetivo de comprender el rol que estarían cumpliendo las citosinas diferencialmente metiladas en la región promotora y su participación en la modulación de la expresión génica, se analizó la presencia de DMC en secuencias que constituyen motivos de unión a factores de transcripción (TF). Para esto se realizó una intersección mediante la función *intersect* de *Bedtools* (v2.30.0) (Quinlan & Hall, 2010) entre la posición de cada DMC y la posición de los motivos contenidos en la base de datos del programa *Homer* (base de datos de motivos de unión a TF conocidos para el genoma de ratón mm10, USCS) (Heinz et al., 2010). De este análisis y utilizando el lenguaje de programación de R, se determinó el número de genes que tienen DMC en motivos de unión a TF, la cantidad de DMC totales por gen y haciendo distinción entre DMC dentro y fuera de motivos, así como los tipos de motivos más frecuentes de tener DMC; todos estos datos se asociaron, además, con la información de expresión diferencial.

6.5 Análisis de enriquecimiento funcional

Para caracterizar la respuesta de las neuronas POMC frente a una dieta alta en grasas, en términos de la metilación de ADN, se realizó una búsqueda de DMC en genes asociados a vías biológicas relevantes en el funcionamiento de estas neuronas, tales como apoptosis, autofagia, ciclo celular, conducta alimenticia, homeostasis de glucosa, metabolismo de lípidos, neuroinflamación, señalización de insulina, señalización de leptina, mitofagia, señalización de quimioquinas y metilación de ADN. Los genes asociados a cada vía biológica se extrajeron mediante de la herramienta *Biomart* de Ensembl. Paralelamente, se realizó un enriquecimiento funcional a partir del total de genes que poseen DMC, los cuales fueron ingresados al servidor web DAVID (Sherman et al., 2022), desde donde se identificaron los términos de ontología génica (GO del inglés *Gene Ontology*) enriquecidos en la categoría de “proceso biológico”.

Del total de genes de cada vía biológica que tenían al menos una DMC, se hizo distinción entre aquellos que varían significativamente su expresión y aquellos que no varían su expresión. A continuación, se realizó una exploración manual y detallada de los genes asociados a cada vía biológica, poniendo especial énfasis en aquellos que presentaban un cambio en su expresión génica.

Cabe mencionar que todos los gráficos asociados al análisis de metilación diferencial, búsqueda de motivos y enriquecimiento funcional fueron contruidos en el programa R con el paquete ggplot2 (v 3.4.0)

7. Análisis estadístico

El peso corporal, ganancia de peso, glicemia basal, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar, siendo n el número de animales utilizados. Para la ingesta calórica, el n corresponde al número de jaulas empleadas. Las diferencias entre condiciones fueron analizadas mediante una prueba t-student. La diferencia se consideró significativa con un valor de $p \leq 0.05$ utilizando el programa de análisis GraphPad Prism 9.



V. RESULTADOS

1. Caracterización de los ratones obesos inducidos por dieta

Ratones machos POMC:eGFP de 8 semanas de edad fueron alimentados con una dieta control (CD) o con una dieta alta en grasa (HFD, 60% de grasa) por un periodo de 11 semanas. Al inicio del experimento, los ejemplares de ambos grupos tenían un peso corporal promedio similar (CD 23.2 ± 2.4 g; HFD 23.9 ± 1.3 g), no obstante, luego de una semana de alimentación con la dieta alta en grasa se observó un aumento significativo en el peso corporal en los animales del grupo HFD, que se acrecentó con el transcurso de las semanas (figura 7A), llegando a una ganancia de peso corporal promedio de 18.0 ± 3.8 g para el grupo HFD y de 6.1 ± 1.8 gramos para el grupo CD (figura 7B). Este aumento en el peso corporal se relaciona con un aumento significativo en las calorías ingeridas durante todo el periodo (figura 7C), y es particularmente mayor durante la primera semana de intervención (CD 11 ± 1.2 kcal/día/animal; HFD 15.5 ± 1.0 kcal/día/animal). En cuanto a la glicemia basal, se evidenció que ambos grupos tienen valores parecidos de glicemia (CD 10.2 ± 1.1 mM; HFD 10.5 ± 0.9 mM) al comienzo de la intervención alimentaria, y que, tras la exposición a la dieta alta en grasa, se generó un aumento significativo de este parámetro en el grupo HFD (CD 9.4 ± 1.6 mM; HFD 12.5 ± 2.4 mM). Al término de la intervención alimentaria (11 semanas), el grupo HFD muestra un aumento significativo en los niveles de colesterol total (CD 98.1 ± 19.2 mg/dL; HFD 184.4 ± 10.8 mg/dL), LDL (CD 17.7 ± 13.3 mg/dL; HFD 88.3 ± 6.9 mg/dL) y, sorprendentemente, HDL (CD 59.6 ± 11.4 mg/dL; HFD 78.8 ± 6.4 mg/dL (figura 7D, 7E, 7G, 7H). No obstante, cabe señalar que no se alcanzaron diferencias significativas en los

niveles de triglicéridos entre el grupo control y aquellos que recibieron la dieta alta en grasa (CD 103.6 ± 20.3 mg/dL; HFD 104.8 ± 24.9 mg/dL) (figura 7F).

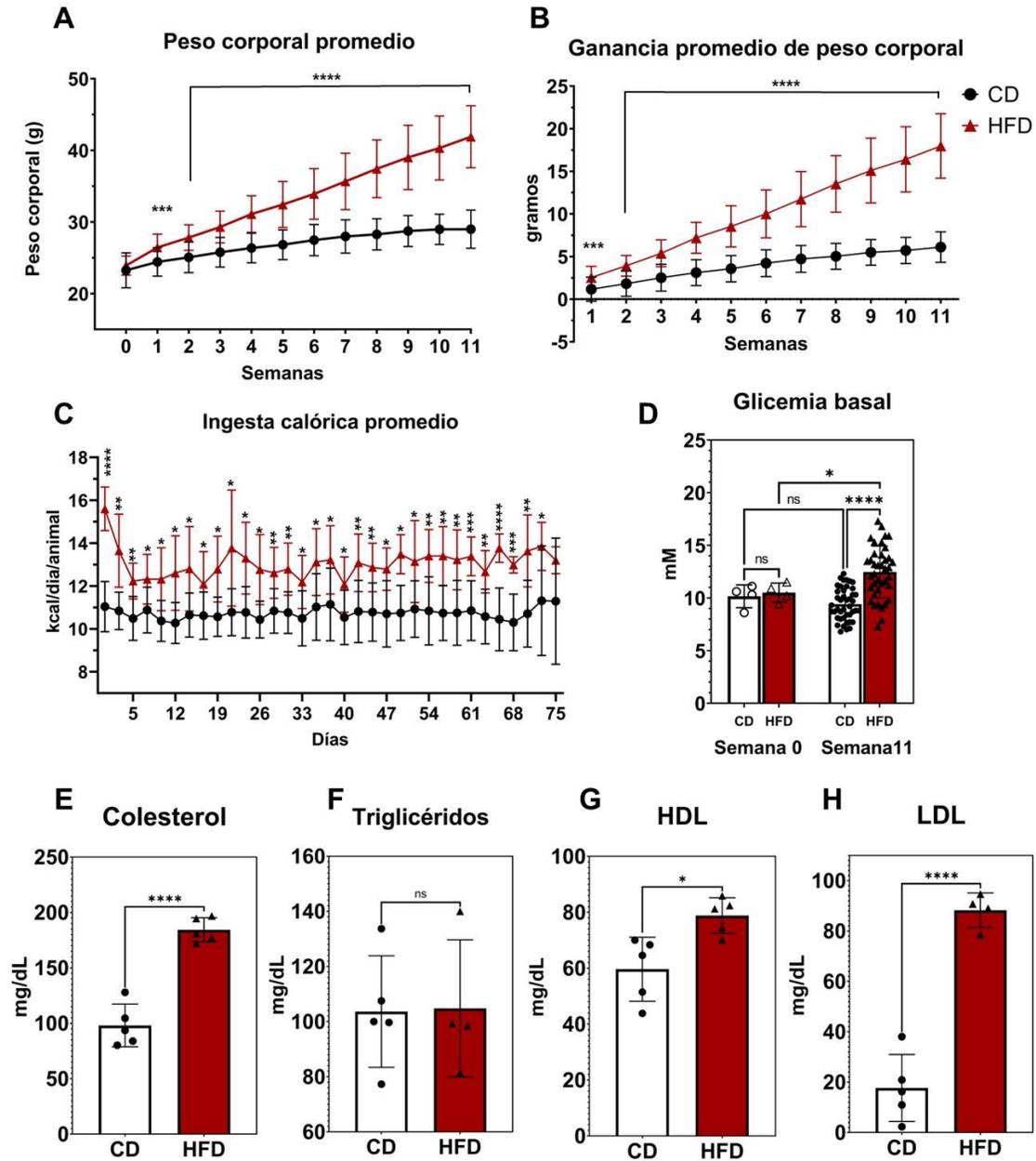


FIGURA 7: EFECTO DE LA DIETA ALTA EN GRASAS EN RATONES POMC:eGFP

(A) Peso corporal promedio de ratones CD y HFD durante cada semana de la intervención alimentaria (n = 27 para CD; n = 17 HFD). (B) Ganancia de peso corporal promedio de ratones CD y HFD acumulativa (n = 27 para CD; n = 17 HFD). (C) Ingesta calórica diaria por animal (n = 7 para CD; n = 4 HFD). (D) Glicemia basal medida al inicio (semana 0, n = 4 para CD; n = 4) y al término de la intervención alimentaria (semana 11, n = 20 para CD; n = 20 HFD). (E) Colesterol total. (F) Triglicéridos. (G) HDL. (H) LDL luego de 11 semanas de intervención dietaria (n = 5 para CD; n = 5 HFD). * p<0,05. ** p<0.01. *** p<0,001. **** p<0,0001. Prueba t-student para todos los análisis.

2. El protocolo de FACS permite una purificación eficiente de neuronas POMC:eGFP

Una vez terminadas las 11 semanas de intervención alimentaria, se procedió con la recolección de cerebros y disección de la región hipotalámica medio basal para llevar a cabo la purificación de las células GFP positivas mediante FACS. En la figura 8 se muestran los perfiles de clasificación jerárquica obtenidos a partir de FACS. La figura 8A y 8B muestran la relación entre FSC y SSC de la muestra de hipotálamo no transgénica (control negativo) y de POMC:eGFP, respectivamente. En esta gráfica cada punto representa un evento detectado y en la región enmarcada (definida como P1) se encuentran todos los eventos seleccionados de acuerdo con su tamaño y granularidad celular, con el fin de eliminar agregados y residuos. Los eventos que componen P1 luego se analizaron de acuerdo con su relación entre SSC-A y SSC-H, lo que permite distinguir eventos que se encuentren a la forma de célula única, y que en este caso se definen como P2 (figura 8C, para muestra no transgénica y 8D, para POMC:eGFP). A continuación, se establecen los

niveles umbrales de fluorescencia, detectada con el filtro FITC, de cada uno de los eventos que integran P2 (Figura 8E y F). Se utilizó el control negativo (figura 8E) para establecer un umbral mínimo de fluorescencia que logre enriquecer la muestra con células GFP+ permitiendo recuperar la mayor cantidad de células positivas. De esta manera, se estableció un umbral de intensidad de fluorescencia desde 10^2 - 10^3 en adelante (P3), el cual permite cierto número de eventos negativos que corresponden a menos del 10% de eventos finales en la muestra (Figura 8G y 8H). Es importante señalar que la mayor cantidad de células GFP+ se encuentran en intensidades cercanas a 10^3 (Figura 8H), lo que explica nuestra decisión de aceptar un cierto porcentaje de contaminación con eventos negativos a fin de aumentar el número de eventos positivos recuperados. Las células sorteadas se observan de acuerdo a tamaño (FSC) y granularidad celular (SSC) en la figura 8I-8J.

Con el fin de evaluar el proceso de purificación o enriquecimiento en neuronas POMC realizado mediante FACS, se determinó la expresión de genes marcadores de diferentes células hipotalámicas mediante un análisis de ARN-seq realizado previamente por nuestro laboratorio siguiendo el mismo protocolo de purificación (datos no publicados). Los genes analizados fueron *Pomc* (marcador de células POMC), *AgRP* (gen marcador de células NPY/AgRP), *Gfap* (marcador de astrocitos), *Vim* (marcador de tanicitos) y *Aif1* (marcador de microglía). Tal como se muestra en la figura 8K, hay una expresión predominante de *Pomc*, que es aproximadamente 1000 veces mayor que la expresión de *Gfap* y *Vim*. Además, no se distingue expresión de *AgRP* ni *Aif1*. En conjunto, estos resultados demuestran que tras la purificación por FACS hay un enriquecimiento de células POMC positivas

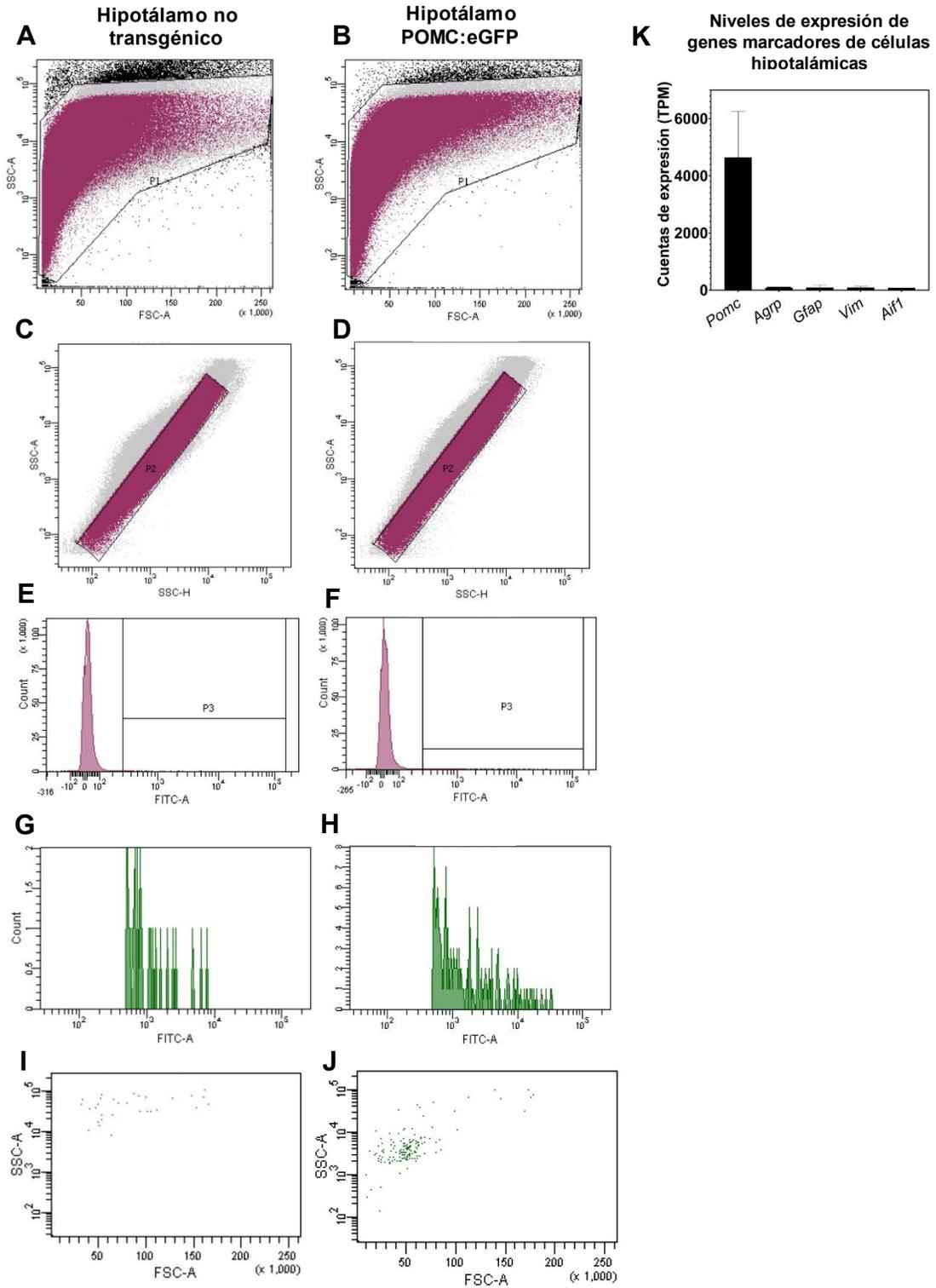


FIGURA 8: PURIFICACIÓN DE CÉLULAS POMC:eGFP MEDIANTE FACS

Células disgregadas de la región hipotalámica de ratones POMC:eGFP alimentados con HFD y CD fueron purificadas mediante FACS. **(A-B)** Gráfico de tamaño (FSC) versus granularidad celular (SSC) obtenido a partir de FACS de células disgregadas del hipotálamo de ratones no transgénicos (A) y ratones transgénicos POMC:eGFP (B). En P1 se marcan todos los eventos considerados células de acuerdo con sus características morfológicas. **(C-D)** Gráfico de SSC-H vs SSC-A para la eliminación de dobletes de una muestra de hipotálamo no transgénico (C) y POMC:eGFP (D). Los eventos enmarcados en P2 representan aquellos que se encuentran a la forma de célula única. **(E-F)** Intensidad de fluorescencia, medida por FITC, de cada uno de los eventos contenidos en P2, tanto para la muestra no transgénica (E) como para POMC:eGFP (F). **(G-H)** Amplificación de la región definida como P3, que involucra eventos con intensidad de fluorescencia desde un valor intermedio entre 10^2 y 10^3 en adelante, para la muestra no transgénica (G) y la muestra POMC:eGFP (H). En el caso de la muestra POMC:eGFP, todos los eventos contenidos en P3 son considerados GFP positivos y, en consecuencia, purificados. **(I-J)** Características morfológicas de células contenidas en P3 para muestra no transgénica (I) y para la muestra POMC:eGFP (J). **(K)** Cuantificación de expresión de genes marcadores de células hipotalámicas a partir de un análisis de ARN-seq de células purificadas por FACS. La cuantificación se realizó con *StringTie* y los valores corresponden al promedio de 3 réplicas, expresados en TPM.

3. Caracterización del estado de metilación a nivel de genoma completo en neuronas POMC en ratones controles y obesos

Con el fin de identificar el estado de metilación del ADN genómico de neuronas POMC en animales controles y obesos, se realizó RRBS-seq desde neuronas purificadas. En la figura 9 A se muestra el patrón de electroforesis capilar de las librerías preparadas para la muestra CD1 y HFD2, donde se distingue que tienen fragmentos distribuidos entre 150 y 1000pb, lo cual es

consistente con el tamaño esperado para fragmentos de ADN genómico digeridos con MspI y con adaptadores en sus extremos. Además, no hay presencia visible de dímeros de primers en ninguna de las muestras, ya que no se evidencian fragmentos con tamaño cercano a 100 pares de bases (figura 9A). Resultado similar fue obtenido para el resto de las muestras (figura S1A). Los valores de concentración molar de todas las muestras están por sobre 1nM, lo que refleja una cantidad suficiente para proceder con la secuenciación (figura S1B).

A continuación, las librerías preparadas fueron secuenciadas por ambos extremos (secuenciación paired-end) tras lo cual se generan 2 archivos por cada muestra (R1 y R2). Estos archivos se sometieron a un análisis de calidad, el cual mostró resultados similares entre las muestras, alcanzando una calidad phred promedio sobre 28 pero con una leve disminución hacia el extremo 3' de las secuencias; y un patrón heterogéneo en el contenido de bases a lo largo de la secuencia, como es característico para experimentos RRBS-seq. No obstante, se identificó una leve contaminación (menor al 5%) con el adaptador *Illumina Universal Adapter* en el extremo 3', y bases no determinadas (N) en el extremo 5' de las secuencias. Por su parte, la longitud de las secuencias abarca un rango entre 35 y 150 pb (figura S2). En base a estos resultados, se realizó el preprocesamiento de los datos crudos eliminando bases de baja calidad, no determinadas y adaptadores, con lo cual se obtuvo una calidad phred sobre 28 a lo largo de toda la secuencia, una distribución de longitud entre 50 y 150 pb y el patrón del contenido de bases característico para experimentos RRBS-seq (figura 9B). Como consecuencia de los filtros aplicados, en cada muestra se elimina cerca del 30% de las

secuencias, quedando con alrededor de 15 millones de secuencias por muestra (figura 9C).

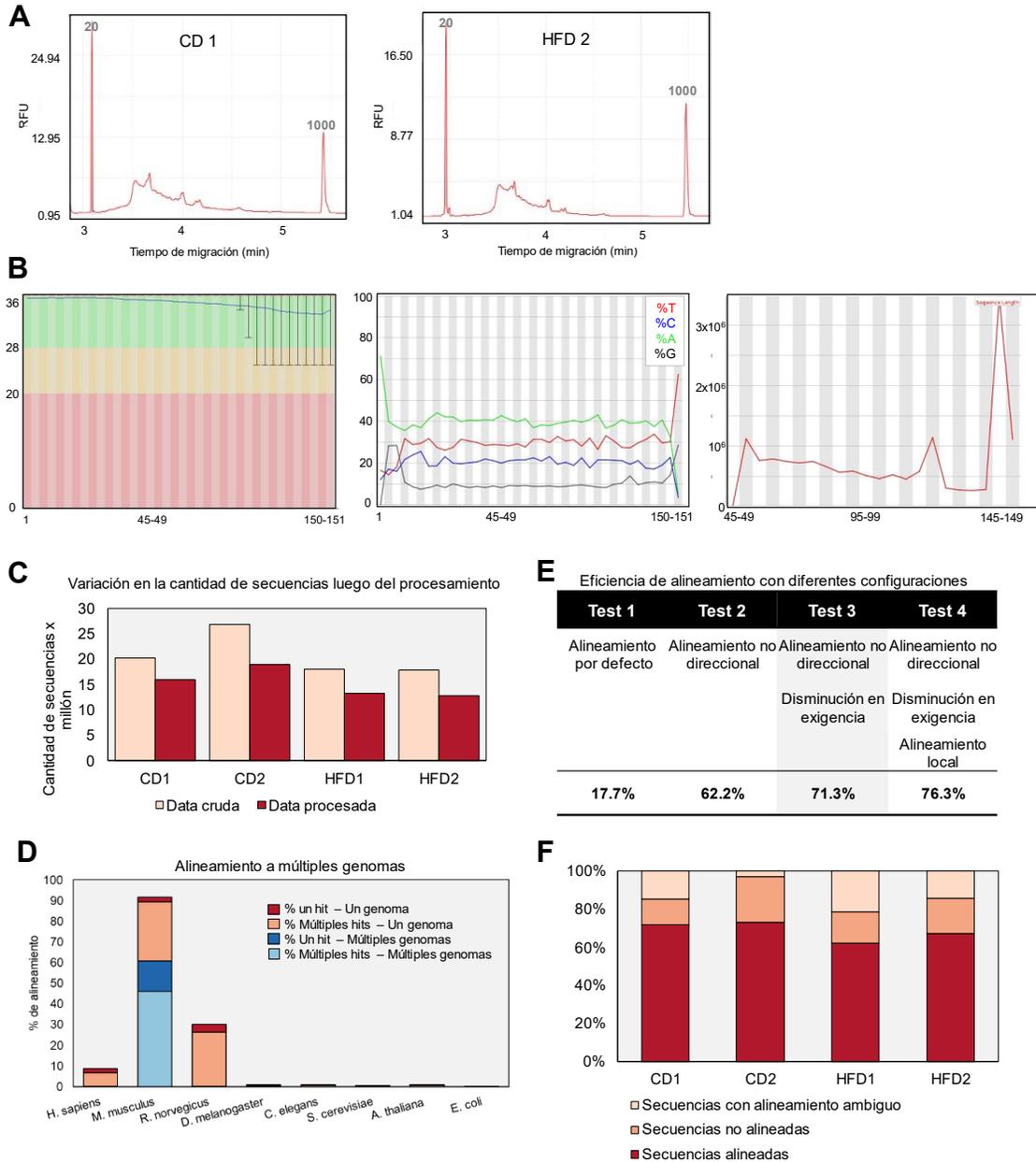


FIGURA 9: PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO DE MUESTRAS RRBS-SEQ

(A) Perfil electroforético de las muestras RRBS CD1 y HFD2. Las señales indicadas con 20 y 1000 corresponde al tamaño en pb del marcador de peso molecular. (B) Resultados de la calidad de los datos secuenciación luego del preprocesamiento. Izquierda: calidad phred de base a lo largo de la secuencia. Centro: contenido de bases a lo largo de la secuencia. Derecha: distribución de longitud de fragmentos. Estos resultados corresponden a la muestra CD1, sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el resto de las muestras. (C) Cantidad de secuencias totales en cada muestra antes y después del preprocesamiento. (D) Alineamiento a múltiples genomas para la muestra CD1. (E) Porcentaje de eficiencia de alineamiento al utilizar 4 diferentes configuraciones de alineamiento. Los valores de eficiencia fueron obtenidos con la muestra CD1. En gris se resalta la configuración seleccionada y utilizada para el resto de las muestras. (F) Reporte del alineamiento para cada una de las muestras. La eficiencia de alineamiento se representa por el porcentaje de secuencias alineadas (barra roja).



Posteriormente, se realizó un análisis de calidad adicional para descartar contaminación de ADN genómico con otra fuente que no sea ratón. En la figura 9D se presenta el resultado obtenido para la muestra CD1, donde se observa que ocurren alineamientos de manera única solo contra el genoma de ratón, alcanzando cerca de un 40% de alineamiento. Además, si bien se observa que hay secuencias que alinean a más de un genoma (principalmente ratón, rata y humano), estas corresponden a regiones genómicas conservadas entre dichas especies. Con este resultado se descarta que exista contaminación con otra especie.

Una vez confirmada que la calidad de los datos es óptima, se procedió a realizar el alineamiento de las secuencias al genoma de referencia. Para ello,

se utilizó el programa *Bismark* en su configuración por defecto, tras lo cual se obtuvo una eficiencia de alineamiento del 17.7% para la muestra CD1 (figura 9E, test1). Alcanzar un bajo porcentaje de eficiencia es un problema frecuente en datos RRBS, debido a la fragmentación con *MspI* y la reducida longitud de las secuencias. No obstante, teniendo certeza que las secuencias provienen de ratón fue posible modificar algunos parámetros del alineamiento a fin de mejorar este porcentaje (Krueger, 2015/2023). Para definir con que configuración se logra una mejor eficiencia de alineamiento, se realizaron 3 test utilizando diferentes parámetros en cada uno. En primera instancia se evaluó la ejecución del alineamiento en modo no direccional, el cual considera que cada secuencia puede provenir de 4 distintas hebras (hebra sentido y antisentido en su forma original o complementaria) y aumenta la complejidad del alineamiento. Con esta configuración, la eficiencia de alineamiento para la muestra CD1 aumentó a un 62.2% (figura 9E, test2). A continuación, se adicionó una segunda modificación, esta vez disminuyendo la exigencia con la que se considera un alineamiento como válido, con lo cual la eficiencia aumenta a un 71.3% (figura 9E, test 3,). Finalmente, se modificó el alineamiento a una modalidad local, obteniéndose un alineamiento con un 76.3% de eficiencia (figura 9E, test 4,). Teniendo en consideración que aplicar un alineamiento local debe considerarse como último recurso puesto que origina una mayor cantidad de alineamientos ambiguos y que no aumenta en gran medida la eficiencia de alineamiento, se decidió utilizar la configuración del test 3 para todas las muestras. Cabe mencionar que la eficiencia de alineamiento obtenida con el test 3, concuerda con el porcentaje de alineamientos únicos (tanto en uno como en múltiples genomas) reportado por *FastQ-Screen* (figura 9D). Una vez ejecutado el alineamiento para todas

las muestras, se obtuvieron valores de eficiencia que varían entre 60 y 70%, con un porcentaje de no alineamiento de aproximadamente un 10% (figura 9F). Notablemente, los valores de eficiencia obtenidos concuerdan con los valores reportados para muestras RRBS de ratón (Matsushita et al., 2018).

Posterior al alineamiento y usando *Bismark*, se extrajo la información del estado de metilación de cada citosina analizada, haciendo distinción en el contexto en que se localiza. Como refleja la figura 10A, las 4 muestras alcanzan cerca de un 80% de metilación en el contexto CpG y un 20% en contextos no-CpG. A partir de la información en contexto CpG se exploró el estado de metilación del gen *Pomc* (principal marcador de este tipo celular), con la finalidad de caracterizar el patrón de metilación en ambas condiciones experimentales y contrarrestar con los cambios identificados en investigaciones anteriores (Shi et al., 2013). Como se observa en la figura 10B, existen diferentes sitios con citosinas metiladas en el gen *Pomc*, en torno a la posición 4.004.000 pb, ubicada corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción; así como en el primer, cuarto y quinto exón de *Pomc*, siendo este último coincidente con la isla CpG 48 anotada para ratón. La mayoría de estas citosinas metiladas coinciden entre las muestras CD y las muestras HFD, indicando reproducibilidad de la metodología, no obstante, y de manera interesante en la posición 4.004.841 (110 pb corriente arriba del TSS) se distingue una citosina metilada en las muestras CD, la cual está ausente en las muestras HFD. Contrario a investigaciones anteriores, no se identificó ninguna posición hipermetilada en las muestras HFD.

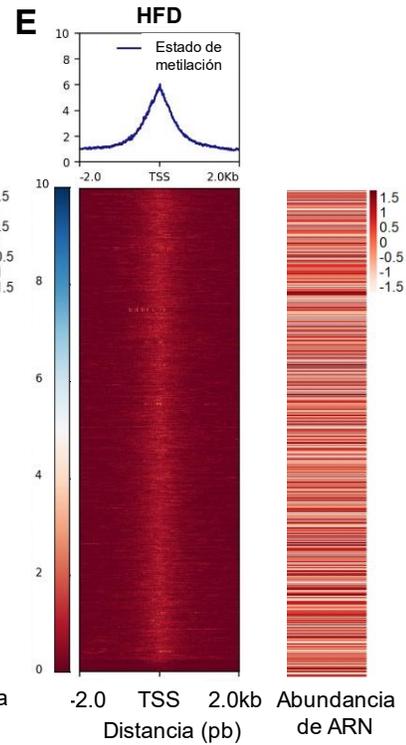
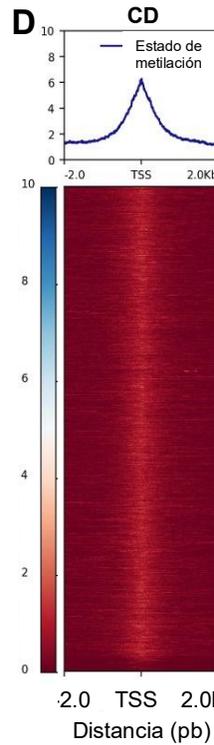
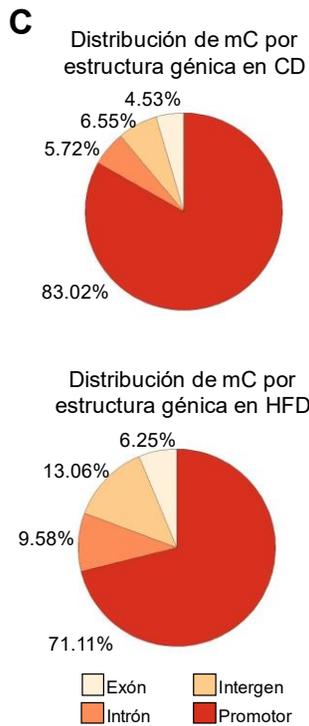
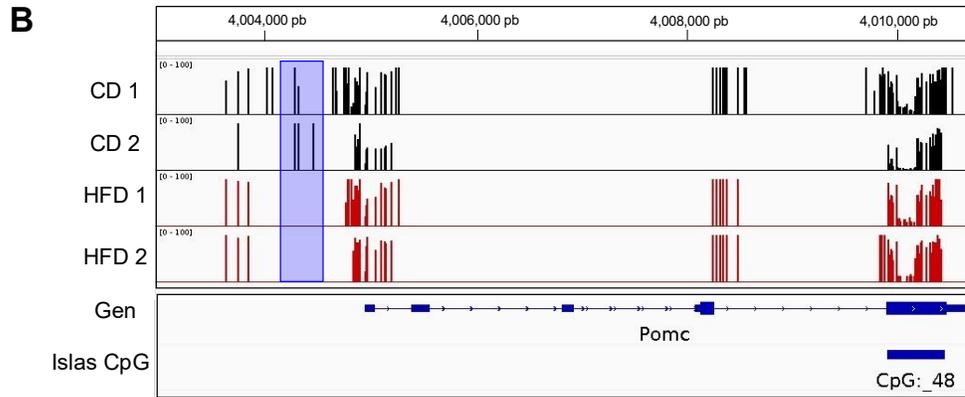
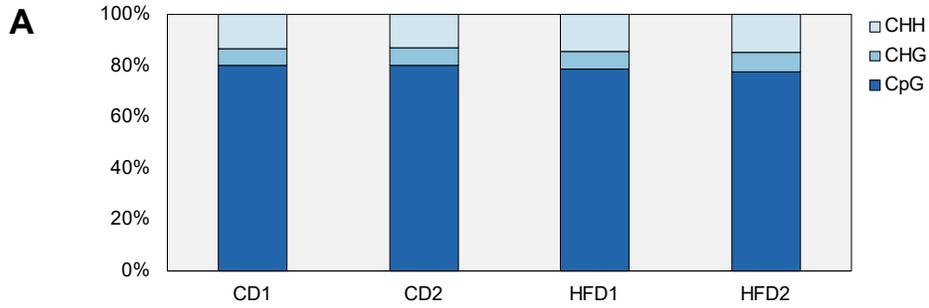


FIGURA 10: CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL ADN DE NEURONAS POMC EN CONDICIÓN CD Y HFD

(A) Porcentaje de citosinas metiladas según contexto para cada muestra. (B) Visualización de citosinas metiladas en la región genómica correspondiente al gen *Pomc*. Cada citosina metilada se representa por una línea negra para las muestras CD o por una línea roja para las muestras HFD, la longitud de cada línea representa el porcentaje de metilación. El recuadro en azul marca la posición en que observa una diferencia entre las muestras de ambas condiciones. En la parte superior se indican las coordenadas genómicas y en la parte inferior se muestra la anotación del gen *Pomc*, donde exones se representan por rectángulos e intrones por líneas; además se muestra la anotación de islas CpG para genoma de ratón. (C) Distribución de citosinas metiladas por estructura génica en ambas condiciones. (D-E) Izquierda: mapa de calor que representa el puntaje de metilación de citosinas en una ventana genómica de 2kb alrededor del TSS, para cada gen activo en neuronas POMC. El orden de genes en el eje y se muestra de manera descendente según el puntaje de metilación. El gráfico superior representa un resumen del puntaje de metilación promedio de todos los genes. Derecha: mapa de calor de abundancia de ARN de genes expresados en neuronas POMC, ordenados de manera descendente según su puntaje de metilación.

Continuando con la caracterización de la metilación de ADN en ambas condiciones experimentales, se analizó la distribución de citosinas metiladas por estructura génica, desde donde se identificó que tanto en CD como en HFD la mayoría de las citosinas se localizan en regiones promotoras (representando un 83 y 71% para CD y HFD respectivamente) a lo que le siguen intrones, regiones intergénicas y en menor medida, exones (figura 10C). A partir de este resultado, se analizó en mayor detalle el estado de metilación de las citosinas en las cercanías de la región promotora analizando una ventana genómica de 2kb corriente arriba y corriente abajo del TSS, para

todos los genes expresados en neuronas POMC. Esta información se representa a través de un mapa de calor, al costado izquierdo de la figura 10D y E (para CD y HFD, respectivamente), que refleja en una escala de color el porcentaje (0% rojo oscuro, 4% rosado claro, 10% azul) de metilación de citosinas a lo largo de la región genómica analizada. El grafico contiene cada uno de los genes activos ordenados, de arriba hacia abajo, de manera descendente según su nivel de metilación, es decir, aquellos con mayor cantidad de metilación se encuentran en la parte superior del gráfico. De esta grafica se desprende que, en ambas condiciones, la metilación esta enriquecida en la región más próxima al TSS y disminuye a medida que se aleja de este punto, lo que se observa más claramente en el grafica resumen de la parte superior del mapa de calor. Dado que la metilación de ADN ha sido clásicamente asociada con una regulación de la expresión génica, se esperaba que aquellos genes cuyos promotores contienen mayor metilación se encuentren menormente expresados. Para confirmar lo anterior, analizamos los niveles de expresión de cada gen con relación a sus niveles de metilación, a través de un mapa de calor con la abundancia de ARN de cada gen que se observa a la derecha de la figura 10D y 10E. Contrario a lo previamente esperado, se puede observar que genes con altos niveles de metilación no nuestras necesariamente bajos niveles de expresión en este análisis que contempla el transcriptoma completo de las neuronas POMC tanto en la condición CD como en la condición HFD. Estos resultados nos impulsan a realizan una caracterización a nivel de secuencia que nos permita identificar el contexto en el cual se encuentran presentes las metilaciones observadas, con el fin de comprender molecularmente las dinámicas de cambios de estas metilaciones y predecir como estas podrían estar envueltas

en la regulación génica asociada a la condición metabólica de nuestros animales.

4. La obesidad inducida por una dieta alta en grasas genera cambios en el patrón de metilación del ADN de neuronas POMC principalmente en motivos de unión a factores de transcripción.

A fin de identificar dinámicas en el estado de metilación de ADN inducida por obesidad, se realizó un test de metilación diferencial entre las muestras CD y HFD. Tras este análisis se obtuvo que, de un total de 749.270 citosinas identificadas, 16.795 se encuentran diferencialmente metiladas (DMC) en la condición HFD con respecto a la condición CD. De estas, 13.141 se encuentran hipermetiladas y 3.654 están hipometiladas (figura S4A). Adicionalmente, se exploró localización de DMC dentro de la estructura de un gen, haciendo distinción entre hiper e hipometilación. Tras lo cual se identificó que, similar a lo ocurrido con el total de citosinas metiladas en ambas condiciones (figura 10C), más del 50% de las citosinas con metilación diferencial se localizan en regiones promotoras de los genes (figura S4C). En concordancia con este resultado, se encontró que la mayoría de las citosinas diferencialmente metiladas se encuentran cercanas al sitio de inicio de la transcripción (figura S4D). En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con una dieta alta en grasa induce una remodelación en el perfil de metilación del ADN de neuronas POMC, principalmente en las regiones promotoras.

Habiendo identificado que la mayoría de las citosinas cuyo estado de metilación varía con la dieta alta en grasa se encuentran cercanas a la región promotora, nos planteamos investigar e identificar si estas DMC pudiesen

estar envueltas en eventos de regulación de la expresión génica y para esto se decidió conducir los análisis posteriores únicamente a aquellas citosinas ubicadas en regiones promotoras. Cabe señalar que debido a que es posible encontrar más de una metilación por gen, las 8.139 DMC ubicadas en esta región, se encuentran repartidas en 4.779 genes.

A continuación, se analizó la relación entre la presencia de DMC en regiones promotoras y variación en la abundancia de ARN de su respectivo gen inducidas por obesidad (Figura 11A). Como se observa en la figura, si bien existe gran número de DMC, un número reducido de estas se encuentran acompañadas de un cambio significativo en la expresión génica (Figura 11A, puntos rojos, DMC; FDR <0.1). Al mismo tiempo, podemos observar que citosinas hipermetiladas se asocian tanto a aumento como disminución génica; esto mismo se observa para citosinas hipometiladas. En términos globales, del total de genes activos, un 3.5% de ellos se encuentran diferencialmente expresados (FDR<0.1); 146 genes aumentan su expresión y 121 disminuyen su expresión (Figura 11B).

Cabe señalar que las condiciones experimentales no incluyeron un estímulo alimenticio previo a la colección de tejidos que pudiese estimular cambios transcriptómicos agudos, si no, representa una intervención alimenticia estacionaria que se prolongó por 11 semanas. Por esta razón, y con el fin de entender el contexto genético de los cambios en el estado de metilación y su posible función en la regulación génica frente a un estímulo metabólico evaluamos presencia de DMC en sitios de unión a factores de transcripción.

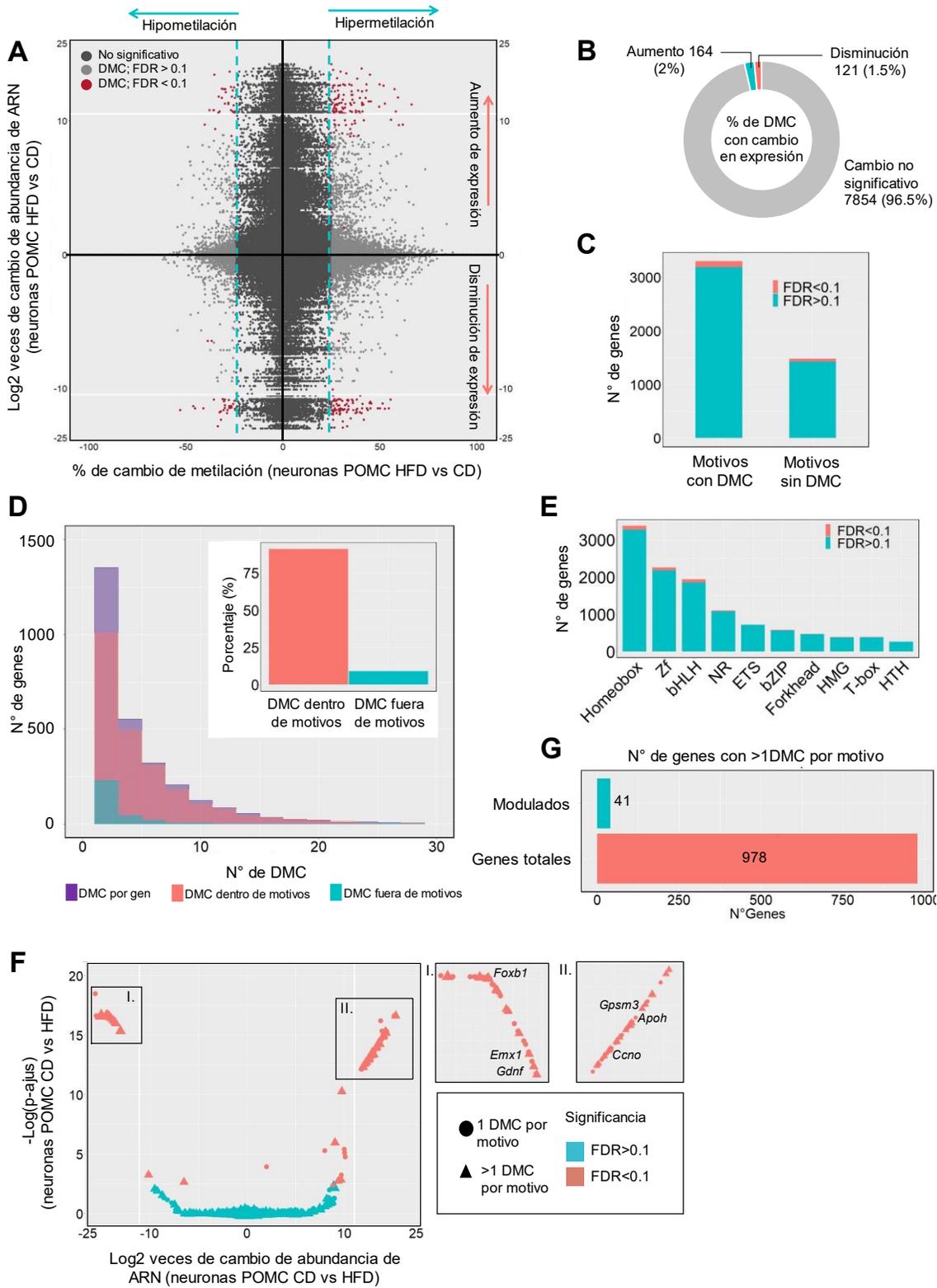


FIGURA 11: CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA DIETA RICA EN GRASA EN EL PERFIL DE METILACIÓN Y LA EXPRESIÓN DE LAS NEURONAS POMC

(A) Correlación entre el cambio de metilación de citosinas ubicadas en la región promotora y la expresión génica. Cada punto representa una citosina la cual está ubicada en el eje X según su porcentaje de cambio de metilación, y en el eje Y según las veces de cambio en la abundancia de ARN del gen. Aquellas coloreadas en gris claro, representan citosinas cuyo cambio de metilación es significativo en la muestra HFD con relación a la muestra CD, es decir, que son DMC; en rojo se marcan aquellas citosinas que son DMC y que además se encuentran en genes cuya expresión varía significativamente (definido por un valor $FDR < 0.1$). (B) Porcentaje de DMC asociadas a genes que aumentan, disminuyen o que su cambio de expresión no es significativo. (C) Cantidad de genes con y sin DMC en motivos de unión a factores de transcripción, distinguiendo entre modulados y no modulados. (D) Histograma con número total de DMC por gen (morado) y divididos entre DMC dentro y fuera de motivos (rosado y turquesa respectivamente). En el gráfico inserto se muestra el porcentaje total de DMC dentro y fuera de motivos. (E) Diez tipos de motivos de unión a factor de transcripción con mayor cantidad de genes con DMC, distinguiendo entre genes modulados y no modulados. (F) Modulación en la expresión de genes que poseen DMC en motivos. La amplificación I representa genes que disminuyen su expresión con la dieta alta en grasa y la amplificación II aquellos que aumentan la expresión. (G) Cantidad total de genes con más de una DMC por motivo y de genes que, además, están modulados.

Interesantemente, se obtuvo que de los 4.779 genes que tienen DMC en su región promotora, 3.299 presentan metilación diferencial dentro de motivos de unión a factores de transcripción (figura 11C). Posteriormente, evaluamos el número de DMC presentes en la región promotora de cada gen y observamos que dos tercios de los genes tienen una DMC, mientras que el tercio restante porta dos o más DMC en su región promotora (barras moradas,

figura 11D). En base a este resultado, nos preguntamos si las DMC identificadas se encuentran distribuidas de manera azarosa en las regiones promotoras o si existe una inclinación a encontrarse en sitios de unión a factores de transcripción. Interesantemente, observamos que el 91% de la DMC identificadas se encuentran dentro de sitios de unión a factores de transcripción (Figura 11D, gráfico inserto). Dentro de los tipos de motivos más frecuentes destacan los motivos homeobox y dedos de zinc (zf) (figura 11E).

Teniendo en cuenta que metilación dentro de motivos de unión a factores de transcripción puede impactar en la regulación de la expresión génica y considerando que un tercio de los genes posee más de una citosina metilada por motivo, se procedió a analizar los datos de expresión diferencial de todos los genes que tienen DMC dentro de motivos (figura 11F), a partir de lo cual se obtuvo que gran parte de los genes que cambian significativamente su expresión en la condición HFD ($FDR < 0.1$), presentan más de una DMC por motivo (Figura 11F, ampliación I. y II.), tal como ocurren con Caja de horquilla B1 (*Foxb1*), Espiráculos vacíos Homeobox 1 (*Emx1*) y el factor neurotrófico derivado de glía (*Gdnf*) que disminuyen su expresión; lo mismo ocurre con el Modulador de señalización de proteína G 3 (*Gpsm3*), Apolipoproteína H (*ApoH*) y con la ciclina O (*Ccno*) que muestran un aumento en su expresión génica. Sin embargo, es interesante que 96% de los genes con más de una DMC por motivo no presenta cambios significativos en su expresión en nuestra condición experimental (figura 11G).

En conjunto, estos resultados indican que el cambio en el estado de metilación inducida por la dieta alta en grasa ocurre en posiciones genómicas

específicas que constituyen motivos de unión a factores de transcripción, no obstante, la metilación por sí sola no es capaz de modular la expresión génica bajo la intervención nutricional estacionaria que contempla nuestro diseño experimental.

5. La obesidad inducida por una dieta rica en grasa saturada modula el estado de metilación del ADN en neuronas POMC pudiendo modular vías biológicas importantes para el funcionamiento y comunicación de estas neuronas

Para predecir la relevancia biológica de la remodelación del perfil de metilación del ADN que afecta a las neuronas POMC inducida por dieta, se analizó el estado de metilación de diferentes genes implicados en vías biológicas conocidas por estar alteradas en estas neuronas durante la obesidad, poniendo especial énfasis, en aquellos genes que, muestran una modulación en su expresión génica. En la figura 12A se pueden observar las diferentes vías analizadas, expresado en metilación diferencial versus significancia en el cambio de expresión (ver leyenda para más información); además de expresar magnitud de cambio de expresión a través de un mapa de calor en la figura 12B. Este análisis nos permitió identificar genes asociados a procesos apoptóticos (*Ntrk1*, *Gdnf* y *Crlf1*), autofagia (*Moap1*), Ciclo celular (*Cdk1*, *Ccno*, *Tgm1*, *kif22* y *hmga2*), conducta alimenticia (*Gal*, *Cartpt*, *Pomc*, *Sirt1*, *Tph2*), diferenciación (*Cnmd*, *Efcab9*, *Fstl3*, *Hmx2*, *Hmx3*, *Irx4*, *Pax2*, *Tnfrsf12a* y *Vegfc*), homeostasis de glucosa (*hkdc1*), metabolismo de lípidos (*Apoh*, *Cyp26a1*, *Plpp4* y *Rab38*), inflamación (*Bcl6*, *Crhbp*, *Gpsm3*, *Loxl3*, *Ltb4r1* y *Syk*), señalización de insulina (*Foxc2*, *Gsk3b*

y *Socs1*) y regulación transcripcional (*Acvrl1*, *Ascl4*, *Bhlha9*, *Bnc1*, *Emx1*, *Fhl2*, *Foxb2*, *Foxi2*, *Irx5*, *Meox1*, *Pax5*, *Pou4f1*, *Runx2*, *Tcf15*, *Vax1*, *Ffp296* y *Zfp593*). En la tabla 3 se muestra un resumen con el detalle de la posición genómica y cambio de cada DMC junto con los valores de abundancia de ARN; la lista completa se encuentra en la figura suplementaria S5.



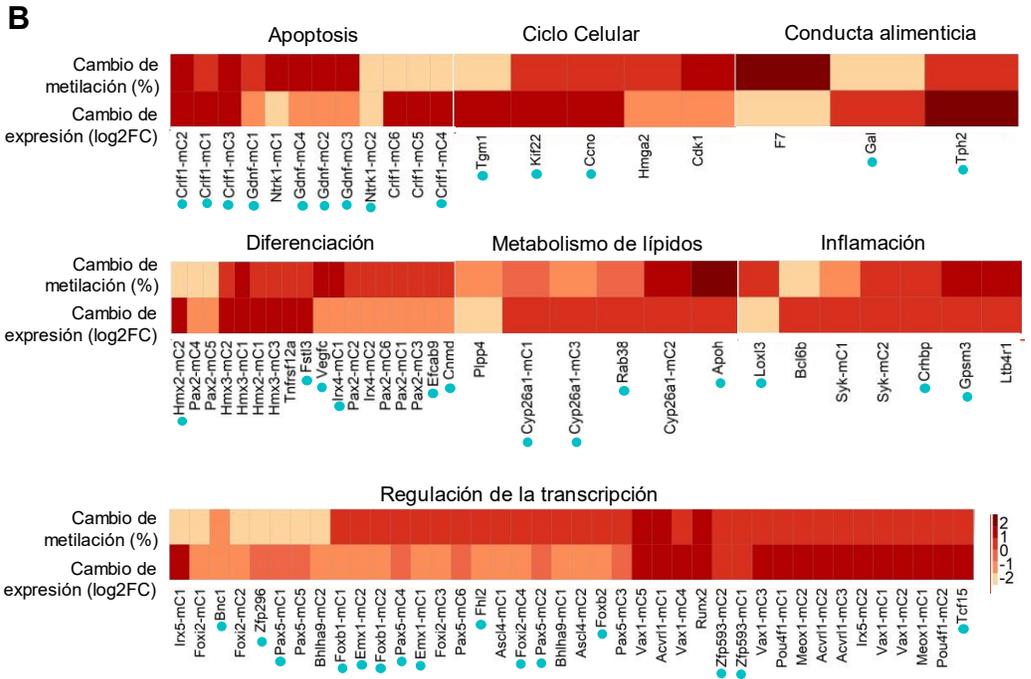
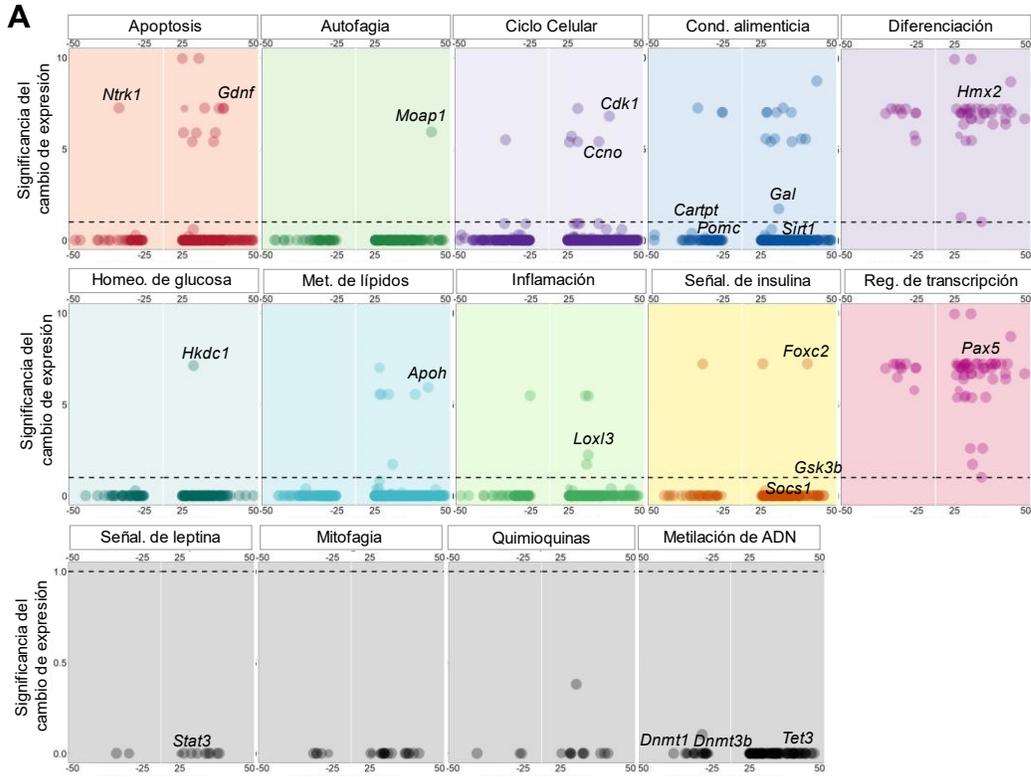


FIGURA 12: RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA ASOCIADA A NEURONAS POMC DE SUJETOS OBESOS INDUCIDOS POR UNA DIETA ALTA EL GRASA

(A) Gráfico de burbuja que representa el cambio de expresión de cada gen asociado a vías biológicas relevantes en neuronas POMC que, además, presentan cambios en la metilación de su región promotora. Cada círculo representa una DMC, cuya ubicación está determinada por su porcentaje de cambio de metilación (en el eje X) y por la significancia en el cambio de la expresión de su gen respectivo (en el eje Y, referido como $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ ajustado})$), de tal forma que a la izquierda se encuentran aquellas citosinas hipometiladas y a la derecha las hipermetiladas, además, si se encuentran en genes cuya expresión varía significativamente, se ubicaran por sobre la línea punteada. (B) Mapas de calor que indica el porcentaje de cambio en el estado de metilación y el cambio en la expresión génica (\log_2 de las veces de cambio de abundancia de ARN), particularmente de aquellos genes que muestran un cambio significativo en su expresión tras la dieta alta en grasa. El círculo turquesa al costado del gen indica que la citosina se ubica dentro de un motivo de unión a factor de transcripción. La nomenclatura 'mC' se utiliza cuando en un mismo gen hay más de una citosina, la posición exacta de cada citosina se muestra en la figura suplementaria S5.

En contraste, ninguno de los genes asociados a señalización de leptina, mitofagia, quimioquinas y metilación del ADN mostró modulación de la expresión significativa. Sin embargo, se observó hipermetilación en el promotor del factor de transcripción STAT3, hipometilación para el gen de las DNA-metil transferasas, *Dnmt1* y *Dnmt3b*, mientras que el gen de la enzima *Tet3* se encontró hipermetilado; en la tabla 4 se muestra el detalle de la posición genómica y cambio de cada DMC junto con los respectivos valores de abundancia de ARN.

De este modo, podemos observar que todas las vías analizadas, conocidas por ser afectadas en obesidad muestran cambios en el estado de metilación, cuyos cambios se concentran en sitios regulatorios. Estos genes describen patrones de regulación de expresión diferencial, sin embargo, la mayoría de estos no muestran variaciones significativas lo que resulta interesante en términos de la respuesta de estas neuronas a diversos estímulos que no han sido contemplados en nuestro diseño experimental.



TABLA 3: ESTADÍSTICA DEL CAMBIO DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA DE GENES MODULADOS POR LA DIETA ALTA EN GRASA

Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC ¹	% de cambio de metilación	Significancia Metilación ²	Cambio de expresión génica ³	Significancia de expresión génica ⁴
Gal	<i>Gal</i>	3464396	31,347	2,12E-08	2,009	0,019
Loxl3	<i>Loxl3</i>	83015595	31,881	5,98E-08	10,050	0,006
Gdnf-mC1	<i>Gdnf</i>	7838848	25,771	0,024	-23,080	6,07E-08
Gdnf-mC2	<i>Gdnf</i>	7838907	39,407	2,91E-06	-23,080	6,07E-08
Gdnf-mC3	<i>Gdnf</i>	7840664	39,483	4,44E-07	-23,080	6,07E-08
Gdnf-mC4	<i>Gdnf</i>	7840666	38,012	2,55E-06	-23,080	6,07E-08
Ntrk1-mC1	<i>Ntrk1</i>	87702260	32,943	1,15E-07	-24,137	6E-08
Ntrk1-mC2	<i>Ntrk1</i>	87702307	-33,824	6,58E-11	-24,137	6E-08
Moap1	<i>Moap1</i>	102709848	45,098	8,54E-11	20,639	1,2E-06

¹ Posición genómica

² Significancia del cambio de metilación definida por el valor-q del test de metilación diferencial

³ Log2 de veces de cambio de abundancia de ARN (HFD versus CD).

⁴ Significancia del cambio de expresión definida por el valor FDR del test de expresión diferencial

TABLA 4: ESTADÍSTICA DEL CAMBIO DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA DE GENES NO MODULADOS POR LA DIETA ALTA EN GRASA

Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC ⁵	% de cambio de metilación	Significancia metilación ⁶	Cambio de expresión génica ⁷	Significancia de expresión génica ⁸
Pomc	<i>Pomc</i>	4004841	-27,619	0,00122	0,483	1
Cartpt-mC1	<i>Cartpt</i>	100036563	-32,855	4,44E-05	0,676	1
Cartpt-mC2	<i>Cartpt</i>	100036636	28,098	0,000491	0,676	1
Stat3-mC1	<i>Stat3</i>	100784482	26,598	2,59E-05	0,260	1
Stat3-mC2	<i>Stat3</i>	100784553	25,087	0,001884	0,260	1
Stat3-mC3	<i>Stat3</i>	100784554	-29,798	0,000552	0,260	1
Dnmt1	<i>Dnmt1</i>	20819881	-26,923	0,000745	-0,370	1
Dnmt3b	<i>Dnmt3b</i>	153491390	-27,885	0,000732	-0,810	1
Tet3	<i>Tet3</i>	83418354	34,567	4,22E-05	0,157	1
MCT2	<i>Slc16a7</i>	125164523	31,571	0,007588	-0,044	1
P2Y ₂	<i>P2ry2</i>	100661399	26,531	3,81E-05	-0,653	1
Atg7	<i>Atg7</i>	114620318	54,628	9,69E-13	-0,579	1
Beclina1	<i>Becn1</i>	101192838	42,616	1,58E-06	-0,165	1

⁵ Posición genómica

⁶ Significancia del cambio de metilación definida por el valor-q del test de metilación diferencial

⁷ Log2 de veces de cambio de abundancia de ARN (HFD versus CD).

⁸ Significancia del cambio de expresión definida por el valor FDR del test de expresión diferencial

VI. DISCUSIÓN

La obesidad inducida por dieta causa una serie de alteraciones en el normal funcionamiento de las neuronas POMC que, en consecuencia, afectan su capacidad de inhibir el apetito. No obstante, pocos son los estudios que se han enfocado en estudiar esta población neuronal purificada y, mucho menos, los efectos que la obesidad tiene en la metilación del ADN de estas neuronas. En el presente trabajo se demostró, por primera vez, que las neuronas POMC de ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasa sufren una profunda modulación del metiloma, la cual ocurre principalmente en sitios que constituyen motivos de unión a factores de transcripción.

Para llevar a cabo esta investigación se utilizó el modelo murino C57BL/6J-Tg(Pomc-EGFP)1Low/J, que al tener un background C57BL6 simula muy bien el progreso de obesidad en humanos puesto que al exponerse a una dieta alta en grasa *ad libitum* se desarrolla hiperinsulinemia e hiperglicemia (Surwit et al., 1988). En específico en este trabajo, la alimentación alta en grasa por 11 semanas, causó un aumento progresivo en el peso corporal, con una ganancia de peso final que es alrededor de 20-30% mayor que en animales controles, similar a lo reportado en otras investigaciones (Collins et al., 2004; Sato et al., 2010). En relación con el consumo de calorías, el resultado presentado en esta investigación debe ser tomado con premura ya que se calculó asumiendo que todos los animales de una misma jaula consumen lo mismo, y no considera la jerarquía social que se establece dentro de un grupo de animales y que afecta la distribución de alimento. Además, estas relaciones dependen de la cantidad de animales, por lo que jaulas con diferente cantidad de animales puede resultar en diferentes conductas

sociales que impactan en el consumo de alimento (C.-Y. Wang & Liao, 2012). La solución más común a este problema, por un lado, es mantener a los animales individualizados, sin embargo, con esto se deja de lado el efecto que el aislamiento tiene en la ingesta alimentaria (Benfato et al., 2022; Sun et al., 2014). Por otro lado, y quizás la alternativa más correcta, es automatizar la medición de consumo con equipamiento especializado, sin embargo, carecemos de este tipo de equipamiento.

Un resultado interesante fue que, tras 11 semanas de alimentación alta en grasa, los animales mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de colesterol HDL, tipo de lipoproteína que transporta colesterol desde tejidos periféricos hasta el hígado donde se metaboliza y excreta, y que esta comúnmente disminuido en sujetos obesos. Este hallazgo concuerda con una investigación previa desarrollada por Silva y cols. (2016) que muestra que ratones C57BL6 alimentados con una dieta compuesta por un 41% de grasa durante 16 semanas, alcanzan valores plasmáticos de HDL significativamente mayores que animales controles (Silva et al., 2016), estos hallazgos destacan la importancia de tomar en cuenta el contexto genético del modelo seleccionado para el estudio. En cuanto a los valores de triglicéridos, nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre ambos grupos, situación que ya ha sido evidenciada previamente por Sato y colaboradores, quienes utilizando ratones machos C57BL6 alimentados con dieta compuesta por un 38% de grasa, reportan un valor promedio de triglicéridos plasmáticos de 113.2 mg/dL, valor similar a los 104.8mg/dL alcanzados en este trabajo (Sato et al., 2010). En conjunto, estos resultados podrían estar reflejando el desarrollo de un mecanismo compensatorio frente

al aumento en el consumo de grasa, lo que de acuerdo con la investigación de Li y cols. (2020) parece ser frecuente en la cepa C57BL6 (J. Li et al., 2020). Por esta razón, se necesitan estudios adicionales para caracterizar esta respuesta considerando, además, que la regulación del metabolismo lipídico es un proceso complejo que está influenciado por múltiples factores tales como la composición de la dieta, el tiempo de exposición y la edad de los animales, estudios que se encuentran fuera del objetivo de esta tesis. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten concluir que en nuestras condiciones experimentales los animales desarrollan un síndrome metabólico, dentro de los parámetros ya documentados, y por ende nos permite validar nuestro modelo.

Antes de discutir de nuestros resultados, quisiéramos mencionar ciertos puntos importantes que inciden en nuestras observaciones, por ende, en las conclusiones y proyecciones de este trabajo. Por un lado, es importante considerar las condiciones experimentales de nuestro trabajo, por ejemplo, dado que el objetivo de este trabajo es investigar el efecto de la obesidad inducida por una dieta rica en grasa saturada, se utilizó una dieta cuya composición incluía un 60% de grasa (de lo cual un 54% corresponde a ácidos grasos saturados) cuya ventaja es el rápido desarrollo del fenotipo obeso y, la cual se extendió por 11 semanas con el fin de evaluar efectos a nivel molecular de una dieta prolongada, semejante al periodo que han sido evaluados por otros investigadores (Marco et al., 2013; Thaler et al., 2012). En este mismo sentido, creemos que una limitación del diseño experimental es no haber incorporado un desafío alimenticio previo al muestreo (tipo “*binge*” o *atracción*) para evaluar dinámicas en la regulación.

Otro aspecto importante a considerar es que los resultados obtenidos en este trabajo representan exclusivamente el efecto de la obesidad inducida por dieta en machos. Diversas investigaciones han demostrado que tanto hormonas sexuales como genes codificados en cromosomas sexuales afectan el control de la homeostasis energética y más aún el funcionamiento de las neuronas POMC, estableciendo así, dimorfismo sexual (De Jesus & Henry, 2022; Morselli et al., 2016; C. Wang & Xu, 2019). En este contexto, existen dos investigaciones que sugieren que las neuronas POMC ejercen un efecto diferente según el sexo, regulando preferentemente el gasto energético en las hembras y la ingesta alimentaria en machos (Hubbard et al., 2019; Reilly et al., 2019). Así también, Wang y colaboradores demostraron que a nivel del núcleo arqueado, el número de neuronas POMC es superior en las hembras las que, además, muestran actividades neuronales más altas (C. Wang et al., 2018). Esta diferencia en la respuesta neuronal podría ser consecuencia del estradiol, una hormona mayoritaria en hembras, que desencadena un aumento en la excitabilidad de las neuronas POMC (Gao et al., 2007). Las diferencias sexuales también se han observado a nivel de expresión génica, pues se ha identificado que la expresión de *Pomc* es mayor en hembras en relación a los machos (G. O. de Souza et al., 2022), lo que podría explicarse por la capacidad que tiene el receptor alfa relacionado con estrógeno ($ERR\alpha$) de unirse al enhancer proximal de *Pomc* hipotalámico, nPE2 (F. S. J. de Souza et al., 2005). De este modo, los hallazgos aquí presentados no pueden ser extrapolados a lo que ocurre en hembras y, por ende, se requieren estudios que utilicen hembras para así disminuir la brecha de género en investigaciones biomédicas.

Por otro lado, una de las principales complicaciones que tuvo el desarrollo de este trabajo investigativo, fue lograr purificar una cantidad suficiente de neuronas que permita extraer suficiente ADN genómico. La manera de sobrellevar esta problemática fue utilizar entre 3 a 5 animales por proceso de purificación, interesantemente no hubo proporción directa entre la cantidad de animales utilizados y el número de células purificadas. Existen diversos factores que afectan el rendimiento en la purificación utilizando FACS, sin embargo, en nuestro caso uno de los factores más importantes es la gran variabilidad en la intensidad de fluorescencia del GFP de nuestros transgénico; situación que solo podía ser evaluada al observar los cerebros en lupa de EPI fluorescencia, previo a la disgregación celular y una vez terminada la intervención alimentaria. La variabilidad en la expresión del transgén, podría ser consecuencia de problemas en la mantención de la línea transgénica previa a nuestro manejo, ya que no actualizar colonias endogámicas (como esta línea transgénica) cada 5 a 10 generaciones aumenta los problemas de deriva génica (Kelmenson, 2018).

Aun cuando la cantidad de células purificadas está muy por debajo de las 9000 células POMC identificadas por análisis estereológicos (Lemus et al., 2015), el protocolo de purificación de neuronas mediante FACS, aquí desarrollado, logró purificar una cantidad similar a lo reportado por el equipo de Lam, donde a partir de 1 animal POMC:eGFP y utilizando un procedimiento similar, se purifican 160 células GFP positivas (Lam et al., 2017). Por otro lado, además de la validación mediante ARN-seq presentada en este trabajo, este protocolo fue validado en un trabajo colaborativo previo de nuestro laboratorio, mediante qRT-PCR obteniendo, igualmente, que hay

un enriquecimiento de células POMC tras la purificación (Órdenes et al., 2021).

Por último, en este trabajo se estudian las neuronas POMC como una única población sin considerar las subpoblaciones de estas neuronas. En ese sentido, variadas investigaciones, empleando diferentes técnicas experimentales, han demostrado la existencia de subpoblaciones de neuronas POMC. Por ejemplo, mediante registros electrofisiológicos se ha identificado que las neuronas POMC excitadas por leptina no son las mismas neuronas POMC que responden a insulina (Williams et al., 2010). Así también, se ha descrito que existen neuronas POMC con propiedades glutamatérgicas, otras con propiedades GABAérgicas, así como neuronas que contienen ambos o ninguno de estos neurotransmisores (Dicken et al., 2012; Saucisse et al., 2021; Wittmann et al., 2013). Investigaciones más recientes empleando secuenciación de ARN de célula única (ARNsc-seq) identificaron 3 subpoblaciones de POMC, que difieren en sus patrones de expresión (Campbell et al., 2017). Lamentablemente, no existen herramientas genéticas desarrolladas que nos permitan realizar una purificación diferencial de estas subpoblaciones neuronales, por lo cual nuestros resultados constituyen un punto de partida necesario para el estudio posterior de estas subpoblaciones.

Con respecto a las estadísticas globales de nuestros perfiles de metilación obtenidos, observamos que el porcentaje de metilación en contextos no-CpG alcanza valores superiores a lo clásicamente reportado para genomas de mamíferos (Couldrey et al., 2014; Orozco et al., 2015; X. Zhang et al., 2017). Sin embargo y de manera interesante, en los últimos años diferentes investigaciones han descrito que las neuronas alcanzan un porcentaje mayor

de metilación en contexto no-CpG (de Mendoza et al., 2021; Guo et al., 2014; Kozlenkov et al., 2014; Lister et al., 2013; Xie et al., 2012). Por ejemplo, en una detallada investigación, Lister y cols. (2013) estudiaron el estado de metilación en contexto no-CpG de células de la corteza frontal de ratones en estado embrionario y en adultos, encontrando que la metilación en este contexto es insignificante en la corteza fetal, pero aumenta notoriamente en adultos, lo que, al relacionarlo con datos de expresión génica, hace sugerir que la metilación no-CpG representa un tipo de regulación génica que se agrega en una etapa de desarrollo posterior. Además, se determinó que este aumento de metilación en contexto no-CpG era exclusivo de neuronas, y no afectaba a células gliales (Lister et al., 2013). Así también, la investigación de Guo y cols. (2014), utilizando secuenciación de bisulfito de genoma completo, identificó aproximadamente un 25% de metilación en contexto no-CpG, en neuronas del giro dentado de ratones adultos, lo cual fue confirmado utilizando metodologías independientes de la conversión de bisulfito (Guo et al., 2014). Este patrón de metilación no-CpG parece ser compartido entre organismos vertebrados y enriquecido en genes altamente conservados que se encuentran reprimidos transcripcionalmente en cerebro adulto (de Mendoza et al., 2021). Por lo tanto, dado que estos datos concuerdan con los hallazgos aquí obtenidos, es posible ratificar la validez de nuestros resultados y afirmar que, en neuronas hipotalámicas adultas, existe cerca de un 20% de metilación en contextos no-CpG, cuya función todavía falta por dilucidar.

Al considerar la metilación a escala genómica, en contextos CpG, presente tanto en muestras CD como en HFD, nuestros resultados indican que la metilación está centrada en la región promotora de los genes, particularmente

en las cercanías del TSS, lo que es consistente con la principal ubicación de las islas CpG, regiones con mayor frecuencia de dinucleótidos CG y donde es más probable de encontrar citosinas metiladas. Así también, al analizar de manera general los datos de metilación de las 4 muestras en estudio, mediante el análisis de componente principal, no fue posible identificar clústeres diferenciados por condición, de lo que se desprende que no hay una diferencia notoria en los patrones de metilación globales entre animales controles y obesos. Sin embargo, al analizar las diferencias que la obesidad inducida por dieta alta en grasa genera en el estado de metilación de citosinas individuales, los resultados demuestran que existen 16.795 citosinas diferencialmente metiladas (DMC), de las cuales cerca del 50% se localizan en promotores. Además, de la distribución por cromosoma de las DMC, resulta llamativo lo que ocurre en el cromosoma mitocondrial donde se obtuvo únicamente hipometilación. A nivel del genoma mitocondrial existe gran controversia sobre la metilación del ADN ya que, se encuentra desprovisto de histonas y, enzimas metilasas no pueden acceder a este organelo. No obstante, en el último tiempo diferentes investigaciones han identificado metilación en genoma mitocondrial (van der Wijst et al., 2017; Zheng et al., 2015), de hecho, un estudio en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa analizó mediante un test de ELISA el estado de metilación del ADN mitocondrial en hepatocitos, encontrando hipometilación global acompañada por un aumento en la transcripción de genes mitocondriales (Yamazaki et al., 2016). Si bien existe basta evidencia que demuestra que en obesidad ocurre una alteración en la actividad mitocondrial caracterizada, por ejemplo, por una remodelación de las crestas mitocondriales (Gómez-Valadés et al., 2021), escasa o nula información existe sobre la dinámica de expresión de genes

codificados en el ADN mitocondrial, y mucho menos sobre la regulación que podría ejercer la metilación, por lo que resulta interesante evaluar en trabajos futuros qué ocurre con la expresión génica mitocondrial y si esto está relacionado con la disminución en el nivel de metilación del ADN.

Al evaluar específicamente lo que ocurre en *Pomc*, podemos notar que, contrario a investigaciones anteriores, no se encontró hipermetilación en ninguna de las citosinas presentes en su promotor e incluso, se identificó hipometilación en una citosina ubicada a 110 pb corriente arriba del TSS. Esta discrepancia podría explicarse por ciertas diferencias experimentales entre nuestro estudio y las investigaciones previas, por ejemplo, en la investigación de Plagemann no hubo obesidad inducida por una dieta en particular, sino que se incrementó la ingesta alimentaria a través de una disminución en la cantidad de animales por jaula (Plagemann et al., 2009); la investigación de Cifani, en cambio, utilizó una dieta compuesta por un 45% de grasa (Cifani et al., 2015). Además, en ambas, junto con la investigación de Marco, el modelo de estudio fueron ratas Sprague Dawley (Marco et al., 2013). Por su parte, en la investigación de Shi, se utilizaron ratones que recibieron una dieta con un 60% de grasa, pero esta se mantuvo por un periodo de 20 semanas, lo que hace sugerir que las 11 semanas empleadas en nuestro trabajo no es tiempo suficiente para evidenciar un aumento en la metilación; no obstante, y similar a nuestros hallazgos, en esta investigación se observó una leve disminución en el porcentaje de metilación de la citosina ubicada a 110 pb corriente arriba del TSS, pero cuya diferencia no alcanza a ser significativa (Shi et al., 2013). Una diferencia importante por destacar entre nuestro estudio y los anteriormente señalados, es que todos estos

exploraron la metilación del ADN a partir de muestras de hipotálamo completo, que incluyen una gran diversidad celular y que, por tanto, no reflejan lo que ocurre particularmente en las neuronas POMC.

Con respecto a la relación entre metilación de ADN y expresión génica, nuestros resultados indican que la metilación diferencial se relaciona con un aumento y disminución de la expresión génica en igual proporción; este resultado, si bien es contrario a la perspectiva clásica donde el aumento en metilación del ADN se asocia exclusivamente con una represión transcripcional, resulta respaldar múltiples investigaciones realizadas en los últimos años (Guilleret et al., 2002; Halpern et al., 2014) donde se ha observado que aumentos en la metilación DNA pueden también aumentar la expresión génica. El mecanismo por el cual la metilación del ADN es capaz de activar la expresión génica no se ha esclarecido, sin embargo, se han propuesto diferentes alternativas; una de ellas postula que los grupos metilo podrían causar una repulsión de factores de transcripción represores, lo que se sustenta en que genes sobreexpresados se encontrarían enriquecidos en motivos de unión a factores de transcripción represores, sensibles a grupos metilo (de Mendoza et al., 2022). Otra alternativa postula que la metilación puede crear nuevos sitios de unión a factores de transcripción pioneros los que tienen la habilidad de unirse directamente a heterocromatina y reclutar a otros factores de transcripción, lo que se respalda en el hecho de que ciertos factores de transcripción pueden interaccionar con grupos metilo, sin la necesidad del dominio MBD (Hu et al., 2013; Zhu et al., 2016). No obstante, y similar a otras investigaciones (Pedersen et al., 2016), nuestros resultados indican que, aun cuando la metilación diferencial puede ocurrir en sitios

específicos que participan en la unión con factores de transcripción, esto no siempre es indicativo de una modulación en la expresión génica, dado que el 96% de las DMC aquí identificadas se encontraban en genes que no presentan modulación en su expresión. Sin embargo, y considerando que, a diferencia de la metilación de ADN, la expresión génica es un proceso altamente dinámico, es posible que la remodelación en la metilación del ADN ocurrida tras la obesidad inducida por dieta condicione la respuesta transcripcional frente a determinado estímulo, situación que no fue considerada en nuestro diseño experimental excepto por la intervención alimenticia prolongada por 11 semanas. Otra posibilidad a la falta de respuesta génica podría ser a la heterogeneidad de las neuronas POMC y la generación de mecanismos compensatorios, en este sentido de Mendoza y cols. (2022) sugieren que la expresión de un gen con importante cambio de metilación en un número reducido de células podría ser compensado por la expresión a cargo de células que no presentan metilación diferencial, lo que se hace notoriamente relevante en poblaciones tan heterogéneas como las neuronas POMC (de Mendoza et al., 2022). Estos hallazgos, en conjunto, reflejan que la regulación ejercida por la metilación del ADN es un proceso complejo y del que todavía faltan muchos aspectos por clarificar.

Por otro lado, los datos obtenidos en esta investigación permiten esclarecer ciertos aspectos controversiales en torno al proceso de detección de cambios en la concentración circulante de ciertos nutrientes y la posterior respuesta ante estos cambios, denominado *sensing*. Existen investigaciones que apuntan a que este proceso es llevado a cabo exclusivamente por neuronas hipotalámicas, como POMC; mientras que, por otro lado, hay quienes

postulan que es necesaria la participación de células gliales como astrocitos y tanicitos. Con respecto al metabolismo lípidos, diferentes investigaciones han propuesto que ácidos grasos de cadena larga pueden ingresar a las neuronas hipotalámicas a través del transportador CD36, un miembro de los receptores depuradores de clase B (Le Foll et al., 2009, 2015), adicionalmente, se ha identificado al receptor de ácidos grasos 1 (FFA1 o GPR40), un receptor acoplado a proteína G, que puede ser activado por ácidos grasos de cadena media y larga y que según análisis de inmunohistoquímica colocaliza con neuronas POMC (Dragano et al., 2017; Haynes et al., 2020; Nakamoto et al., 2013). Sin embargo, nuestros datos de ARN-seq, generados desde neuronas POMC purificadas, indican que no hay expresión de estas moléculas en ninguna de las condiciones experimentales; lo que descartaría la idea de que ácidos grasos son censados por estas neuronas.

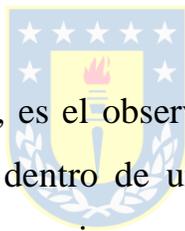


Otro nutriente que ha generado debate es la glucosa; O'Malley y cols. (2006) proponen que puede ser censada por neuronas gracias a la participación del transportador SGLT en un proceso que involucra de cotransporte de glucosa y Na^+ , de modo que el aumento de cargas positivas (debido al ingreso de Na^+) causaría la depolarización y excitación neuronal (O'Malley et al., 2006), no obstante, la veracidad de este mecanismo se basa en la acción de SGLT, transportador que de acuerdo a nuestros datos, no se encuentra en neuronas POMC; en cambio, si se obtuvo expresión de *Slc16a7*, gen que codifica al transportador de monocarboxilato 2 (MCT2), que permite la entrada del lactato liberado desde los tanicitos luego de la metabolización de glucosa en estas células gliales; lo que contribuiría a confirmar la participación de los

tanicitos durante el *sensing* de glucosa (Cortes-Campos et al., 2013; Órdenes et al., 2021). En esa misma línea, se ha propuesto que, luego de la ingesta alimenticia, el aumento y liberación de ATP desde los tanicitos (ya sea por la metabolización de glucosa o ácidos grasos), podría impactar en la actividad de las neuronas POMC a través de receptores purinérgicos (Salgado et al., 2021); en apoyo a esta idea, nuestros datos muestran que las neuronas POMC expresan 4 tipos diferentes de receptores purinérgicos (P2Y₁, P2Y₂, P2X₄ y P2X₂). No obstante, cabe mencionar que, si bien nuestros datos confirman la expresión de MCT2 y de receptores purinérgicos, estos no se encuentran modulados por la obesidad inducida por dieta y solo MCT2 y P2Y₂ presentan una citosina diferencialmente metilada en su región promotora.

Entre los genes que tienen metilación diferencial y si se encuentran modulados por la obesidad inducida por dieta, destaca *Gal*, un gen que puede dar origen a dos productos diferentes dependiendo del procesamiento proteolítico, galanina y el péptido asociado al mensaje de galanina (GMAP). En particular, la galanina ha sido fuertemente relacionada con el control de la ingesta alimenticia, y en especial, con el consumo de grasas. En este contexto, la investigación de Yun y cols. (2005) identificó que tras una inyección de *Gal* en el PVN, ocurre un aumento en la ingesta alimenticia, lo que es particularmente notorio y más prolongado en aquellos animales alimentados con una dieta alta en grasa (Yun et al., 2005). Así también, se ha identificado que el consumo de una dieta alta en grasa por 21 días estimula la expresión de *Gal* en el PVN (Dourmashkin et al., 2005; Leibowitz et al., 2004), con lo cual se ha propuesto que galanina funciona con un circuito de retroalimentación positiva, en que el consumo de dieta alta en grasa estimula

la expresión de *Gal* y esto, a su vez, incrementa la ingesta alimenticia (Barson et al., 2010). Este comportamiento se evidencia también en nuestros datos, puesto que animales alimentados con una dieta alta en grasa por 11 semanas muestran un aumento significativo tanto en la expresión de *Gal* en neuronas POMC, como en las calorías diarias ingeridas; de modo que esto podría estar contribuyendo en la mantención del fenotipo obeso. Además, el aumento en la expresión de este neuropéptido particularmente en las neuronas POMC sugiere que, frente a obesidad inducida por dieta, ocurre cierto deterioro en el carácter anorexigénico de estas neuronas; esto respaldado con el inexistente aumento en la expresión del neuropéptido anorexigénico *Pomc* frente a un exceso energético (como el que se origina con la dieta alta en grasa).



Comportamiento similar a *Gal*, es el observado en *Loxl3*, una enzima lisil oxidasa, cuya hipermetilación dentro de un motivo de unión a factor de transcripción, está asociada con un incremento en su expresión génica. El funcionamiento de esta enzima está relacionado con una restricción en la diferenciación de células inmune y la respuesta inflamatoria, lo que interesantemente, ocurre a través de la deacetilación del factor de transcripción STAT3 reprimiendo su dimerización en el núcleo (Ma et al., 2017). Considerando que la respuesta a leptina por parte de las neuronas POMC es mediada por STAT3, es posible sugerir que el impedimento en la dimerización de STAT3, causada por un incremento de LOX3, este contribuyendo en la generación de resistencia a leptina; un mecanismo que, en concordancia con nuestros datos, no requiere una modulación en la expresión génica de este factor de transcripción.

Otra de las respuestas evidenciadas por las neuronas POMC tras la inducción de obesidad, es la modulación transcriptómica de genes asociados a apoptosis, particularmente se observó una disminución en la expresión de *Gdnf*, factor neurotrófico derivado de glía, con 4 DMC dentro de motivos de unión a factores de transcripción y cuya disminución es capaz de prevenir la apoptosis a través de un mecanismo que involucra a la caspasa 8 y al receptor con dominio de muerte FADD (Yu et al., 2008); así también, su disminución se ha asociado con un aumento en la tasa de apoptosis neuronal en patologías como Parkinson y encefalopatías por hipoxia (S.-J. Li et al., 2014; Siegel & Chauhan, 2000). En el contexto de obesidad, un estudio de Mwangi y colaboradores muestran que una sobreexpresión de este gen en astrocitos se asocia con una resistencia al desarrollo de obesidad en animales alimentados con dieta alta en grasa, en base a este hallazgo proponen que el *Gdnf* tiene un efecto protector sobre el desarrollo de obesidad (Mwangi et al., 2014). Además, recientemente se ha identificado en una línea celular de neuronas, que su expresión puede ser modulada a partir de cambios en la metilación de su promotor en respuesta al ácido poliinsaturado EPA (ácido eicosapentaenoico; 20:5 ω -3) (Ceccarini et al., 2022); en conjunto, estos datos avalan los resultados aquí obtenidos y permiten apoyar el supuesto de que, tras la inducción de obesidad por dieta alta en grasa prolongada, una remodelación en el promotor de este gen, se asocia con una disminución en su expresión génica lo que, a su vez, contribuye con la generación de apoptosis. En esta misma línea, otro gen asociado a apoptosis y cuya expresión se encuentra modulada frente a la obesidad inducida por dieta, es *Ntrk1*, que codifica el receptor tirosina quinasa neurotrófica tipo 1, y cuya expresión esta modulada a la baja en nuestros datos. Por un lado, hay estudios

sobre este gen que lo han asociado a apoptosis ya que es capaz de activar a ciertas caspasas e inhibir a p53 (Jung et al., 2008; Jung & Kim, 2008; Lavoie et al., 2005). Por otro lado, hay estudios que proponen que el aumento de este gen disminuye la actividad de catalasas resultando en un incremento en la producción de ROS y en consecuencia conduce a autofagia (Dadakhujiev et al., 2009; Morello et al., 2021), de modo que, se podría hipotetizar que la disminución de este gen podría estar contribuyendo tanto a la generación de apoptosis como a la disminución de autofagia. Situación similar ocurre con *Moap1*, gen que se encuentra sobre expresado en nuestros datos y que codifica el Modulador de apoptosis 1, una proteína de la membrana mitocondrial capaz de unirse a Bax e inducir apoptosis a través de la salida del citocromo c desde la mitocondria (Su et al., 2022; Tan et al., 2001). Tal como ocurre con *Ntrk1*, *Moap1* ha sido asociado, además, con una promoción de la autofagia debido a su interacción con la proteína LC3 para permitir el cierre del fagoforo, un proceso requerido en la maduración del autofagosoma (Chang et al., 2021). Considerando que estudios anteriores han determinado que, a nivel hipotalámico, el desarrollo de obesidad está asociado con un incremento en apoptosis y disminución de autofagia, es posible hipotetizar que el aumento de *Moap1*, junto con la disminución de *Ntrk1* y *Gdnf*, están en su conjunto, favoreciendo el desarrollo de apoptosis en las neuronas POMC de ratones obesos. Sin embargo, genes esenciales con el desarrollo de autofagia como *Atg7* y *Becn1* no muestran un cambio significativo en su expresión génica (Collier et al., 2021; Wirawan et al., 2012) por lo cual, consideramos que nuestros datos no muestran evidencia suficiente para suponer que este proceso esta alterado en neuronas POMC.

Cabe señalar que, a excepción de *Gal*, ninguno de estos genes ha sido previamente asociado con obesidad a nivel hipotalámico, por lo que se hacen necesarios análisis adicionales para comprender certeramente la función que estarían cumpliendo en las neuronas POMC y como esto contribuye en la mantención de la obesidad. Del mismo modo, es necesario validar que el cambio en el estado de metilación de la región promotora de los genes esta, efectivamente, influenciando la modulación transcripcional evidenciada en nuestros resultados.

En base a lo anteriormente expuesto, es posible concluir de esta investigación que la obesidad inducida por una dieta alta en grasas causa una remodelación importante en el perfil de metilación global de las neuronas POMC, lo que ocurre principalmente en regiones promotoras de los genes y, más específicamente aun, dentro de motivos de unión a factores de transcripción (figura 13). Estos cambios en el estado de metilación, si bien ocurren en varios genes relevantes en el funcionamiento de las neuronas POMC (como *Pomc*, *Cartpt* y *Stat3*), tienen una reducida respuesta transcripcional en las condiciones experimentales del presente trabajo.

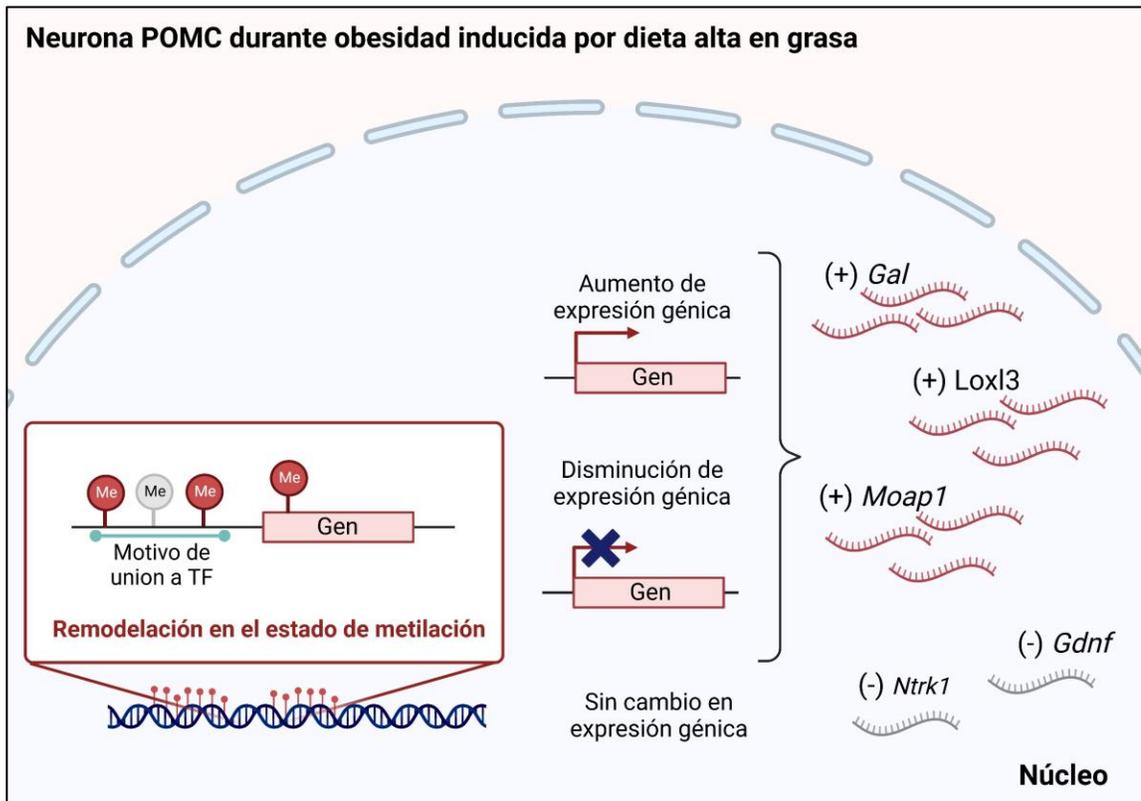


FIGURA 13: MODELO DEL EFECTO QUE SUFREN LAS NEURONAS POMC EN OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA ALTA EN GRASAS A NIVEL DE METILACIÓN DE ADN.

Con la inducción de obesidad a partir de una dieta alta en grasa, las neuronas hipotálamicas POMC sufren una importante remodelación en el estado de metilación de citosinas, lo que ocurren principalmente en sitios que constituyen motivos de unión a factores de transcripción. Esta remodelación en la metilación está asociada con una reducida respuesta transcripcional, que involucra tanto un aumento, como una expresión génica. Entre los genes que tienen metilación diferencial y ven aumentada su expresión destaca *Gal*, *Loxl3* y *Moap1*. Mientras que entre los genes con metilación diferencial que disminuyen su expresión se encuentra *Gdnf* y *Ntrk1*.

Además, y en sintonía con investigaciones actuales, se determinó que el aumento de metilación está relacionado tanto con una disminución como con un aumento de la expresión génica, a partir de lo cual se podría estar favoreciendo el consumo de grasa, la resistencia a leptina y la apoptosis. De esta manera, es importante destacar que estos resultados, son los primeros en dilucidar los efectos que la obesidad causa en la metilación de ADN a nivel genómico y más específico aún en neuronas POMC purificadas. Así también, a partir de los resultados de esta investigación se da pie para estudiar una serie de aspectos que no fueron considerados en este trabajo, tal como la metilación que ocurre en contextos no-CpG, y la metilación diferencial en sitios diferentes a las regiones promotoras. Por último, y a modo de proyección, resultaría interesante realizar estudios adicionales para evaluar si las marcas de metilación que ocurren tras la inducción de obesidad son estables en el tiempo y pueden permanecer luego de una baja del peso corporal, así como utilizar dietas de cafetería que incluyen alimentos sabrosos, densos energéticamente, que asemejan los alimentos procesados tan comunes en la alimentación humana y, de esta manera, contribuir a la proyección de este modelo a la obesidad desarrollada en humanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S., Garrett-Bakelman, F. E., Figueroa, M. E., Melnick, A., & Mason, C. E. (2012). methylKit: A comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biology*, *13*(10), R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r87>
- Akiyama, M., Okada, Y., Kanai, M., Takahashi, A., Momozawa, Y., Ikeda, M., Iwata, N., Ikegawa, S., Hirata, M., Matsuda, K., Iwasaki, M., Yamaji, T., Sawada, N., Hachiya, T., Tanno, K., Shimizu, A., Hozawa, A., Minegishi, N., Tsugane, S., ... Kamatani, Y. (2017). Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nature Genetics*, *49*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/ng.3951>
- Al Adhami, H., Bardet, A. F., Dumas, M., Cleroux, E., Guibert, S., Fauque, P., Acloque, H., & Weber, M. (2022). A comparative methylome analysis reveals conservation and divergence of DNA methylation patterns and functions in vertebrates. *BMC Biology*, *20*(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01270-x>
- Alegría-Torres, J. A., Baccarelli, A., & Bollati, V. (2011). Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, *3*(3), 267-277. <https://doi.org/10.2217/epi.11.22>
- Ambrosi, C., Manzo, M., & Baubec, T. (2017). Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, *429*(10), 1459-1475. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.008>
- Andrews, S. (2010). *Babraham Bioinformatics—FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, *14*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Arletti, R., Benelli, A., & Bertolini, A. (1989). Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*, *10*(1), 89-93. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(89\)90082-X](https://doi.org/10.1016/0196-9781(89)90082-X)
- Arruda, A. P., Milanski, M., Coope, A., Torsoni, A. S., Ropelle, E., Carvalho, D. P., Carvalheira, J. B., & Velloso, L. A. (2011). Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis,

- Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion. *Endocrinology*, 152(4), 1314-1326. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0659>
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), Article 7410. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
- Ávalos, Y., Hernández-Cáceres, M. P., Lagos, P., Pinto-Nuñez, D., Rivera, P., Burgos, P., Díaz-Castro, F., Joy-Immediato, M., Venegas-Zamora, L., Lopez-Gallardo, E., Kretschmar, C., Batista-Gonzalez, A., Cifuentes-Araneda, F., Toledo-Valenzuela, L., Rodriguez-Peña, M., Espinoza-Caicedo, J., Perez-Leighton, C., Bertocchi, C., Cerda, M., ... Morselli, E. (2022). Palmitic acid control of ciliogenesis modulates insulin signaling in hypothalamic neurons through an autophagy-dependent mechanism. *Cell Death & Disease*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05109-9>
- Balasubramanian, D., Akhtar-Zaidi, B., Song, L., Bartels, C. F., Veigl, M., Beard, L., Myeroff, L., Guda, K., Lutterbaugh, J., Willis, J., Crawford, G. E., Markowitz, S. D., & Scacheri, P. C. (2012). H3K4me3 inversely correlates with DNA methylation at a large class of non-CpG-island-containing start sites. *Genome Medicine*, 4(5), 47. <https://doi.org/10.1186/gm346>
- Banno, R., Zimmer, D., Jonghe, B. C. D., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., & Bence, K. K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 720-734. <https://doi.org/10.1172/JCI39620>
- Barson, J. R., Morganstern, I., & Leibowitz, S. F. (2010). Galanin and Consummatory Behavior: Special Relationship with Dietary Fat, Alcohol and Circulating Lipids. *Experientia supplementum* (2012), 102, 87-111.
- Baskin, D. G., Breininger, J. F., & Schwartz, M. W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, 48(4), 828-833. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.4.828>
- Bell, C. G., Walley, A. J., & Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrg1556>
- Benfato, I. D., Quintanilha, A. C. S., Henrique, J. S., Souza, M. A., Rosário, B. dos A., Beserra Filho, J. I. A., Santos, R. L. O., Ribeiro, A. M., Le Sueur Maluf, L., & de Oliveira, C. A. M. (2022). Effects of long-term

- social isolation on central, behavioural and metabolic parameters in middle-aged mice. *Behavioural Brain Research*, 417, 113630. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113630>
- Benite-Ribeiro, S. A., Putt, D. A., Soares-Filho, M. C., & Santos, J. M. (2016). The link between hypothalamic epigenetic modifications and long-term feeding control. *Appetite*, 107, 445-453. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.08.111>
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, 23(7), 781-783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>
- Bird, A. P., & Wolffe, A. P. (1999). Methylation-Induced Repression—Belts, Braces, and Chromatin. *Cell*, 99(5), 451-454. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81532-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81532-9)
- Bochtler, M., Kolano, A., & Xu, G.-L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *BioEssays*, 39(1), e201600178. <https://doi.org/10.1002/bies.201600178>
- Br, O., Md, D., Ms, C., Vj, H., Em, S., & Jg, V. (1991). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*, 12(1). [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90176-p](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90176-p)
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 15043-15048. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15043>
- Cain, J. A., Montibus, B., & Oakey, R. J. (2022). Intragenic CpG Islands and Their Impact on Gene Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.832348>
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New England Journal of Medicine*, 348(17), 1625-1638. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>
- Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H., Pers, T. H., Lyubetskaya, A., Tenen, D., Goldman, M., Verstegen, A. M. J., Resch, J. M., McCarroll, S. A., Rosen, E. D., Lowell, B. B., & Tsai, L. (2017). A Molecular Census of Arcuate Hypothalamus and Median Eminence Cell Types. *Nature neuroscience*, 20(3), 484-496. <https://doi.org/10.1038/nn.4495>

- Cawley, N. X., Li, Z., & Loh, Y. P. (2016). 60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of Molecular Endocrinology*, *56*(4), T77-T97. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0323>
- Ceccarini, M. R., Ceccarelli, V., Codini, M., Fettucciari, K., Calvitti, M., Cataldi, S., Albi, E., Vecchini, A., & Beccari, T. (2022). The Polyunsaturated Fatty Acid EPA, but Not DHA, Enhances Neurotrophic Factor Expression through Epigenetic Mechanisms and Protects against Parkinsonian Neuronal Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijms232416176>
- Chang, H.-C., Tao, R. N., Tan, C. T., Wu, Y. J., Bay, B. H., & Yu, V. C. (2021). The BAX-binding protein MOAP1 associates with LC3 and promotes closure of the phagophore. *Autophagy*, *17*(11), 3725-3739. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1896157>
- Cifani, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Pucci, M., Giusepponi, M. E., Romano, A., Di Francesco, A., Maccarrone, M., & D'Addario, C. (2015). Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: Possible targets for obesity prediction? *Frontiers in Neuroscience*, *9*, 187. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00187>
- Cnop, M., Foufelle, F., & Velloso, L. A. (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(1), 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.010>
- Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., Pradhan, S., Nelson, S. F., Pellegrini, M., & Jacobsen, S. E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, *452*(7184), Article 7184. <https://doi.org/10.1038/nature06745>
- Collier, J. J., Suomi, F., Oláhová, M., McWilliams, T. G., & Taylor, R. W. (2021). Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, *13*(12), e14824. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114824>
- Collins, S., Martin, T. L., Surwit, R. S., & Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: Physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*, *81*(2), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006>

- Cone, J. J., Chartoff, E. H., Potter, D. N., Ebner, S. R., & Roitman, M. F. (2013). Prolonged High Fat Diet Reduces Dopamine Reuptake without Altering DAT Gene Expression. *PLOS ONE*, 8(3), e58251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058251>
- Cone, R. D., Cowley, M. A., Butler, A. A., Fan, W., Marks, D. L., & Low, M. J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25 Suppl 5, S63-67. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martínez, F., Boric, K., Nualart, F., & Garcia-Robles, M. A. (2013). MCT2 Expression and Lactate Influx in Anorexigenic and Orexigenic Neurons of the Arcuate Nucleus. *PLOS ONE*, 8(4), e62532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062532>
- Couldrey, C., Brauning, R., Bracegirdle, J., Maclean, P., Henderson, H. V., & McEwan, J. C. (2014). Genome-Wide DNA Methylation Patterns and Transcription Analysis in Sheep Muscle. *PLOS ONE*, 9(7), e101853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101853>
- Coupé, B., Ishii, Y., Dietrich, M. O., Komatsu, M., Horvath, T. L., & Bouret, S. G. (2012). Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metabolism*, 15(2), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.016>
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), Article 6836. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., ... Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649-661. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1)

- Dadakhuaev, S., Jung, E. J., Noh, H. S., Hah, Y.-S., Kim, C. J., & Kim, D. R. (2009). Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death. *Autophagy*, 5(1), 103-105. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7276>
- De Jesus, A. N., & Henry, B. A. (2022). The role of oestrogen in determining sexual dimorphism in energy balance. *The Journal of Physiology*, n/a. <https://doi.org/10.1113/JP279501>
- de Mendoza, A., Nguyen, T. V., Ford, E., Poppe, D., Buckberry, S., Pflueger, J., Grimmer, M. R., Stolzenburg, S., Bogdanovic, O., Oshlack, A., Farnham, P. J., Blancafort, P., & Lister, R. (2022). Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biology*, 23(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02728-5>
- de Mendoza, A., Poppe, D., Buckberry, S., Pflueger, J., Albertin, C. B., Daish, T., Bertrand, S., de la Calle-Mustienes, E., Gómez-Skarmeta, J. L., Nery, J. R., Ecker, J. R., Baer, B., Ragsdale, C. W., Grützner, F., Escriva, H., Venkatesh, B., Bogdanovic, O., & Lister, R. (2021). The emergence of the brain non-CpG methylation system in vertebrates. *Nature Ecology & Evolution*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01371-2>
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192-4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>
- de Souza, F. S. J., Santangelo, A. M., Bumashny, V., Avale, M. E., Smart, J. L., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2005). Identification of Neuronal Enhancers of the Proopiomelanocortin Gene by Transgenic Mouse Analysis and Phylogenetic Footprinting. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3076-3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.8.3076-3086.2005>
- de Souza, G. O., Wasinski, F., & Donato, J. (2022). Characterization of the metabolic differences between male and female C57BL/6 mice. *Life Sciences*, 301, 120636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120636>
- Deaton, A. M., Webb, S., Kerr, A. R. W., Illingworth, R. S., Guy, J., Andrews, R., & Bird, A. (2011). Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Research*, 21(7), 1074-1086. <https://doi.org/10.1101/gr.118703.110>

- de Sena Brandine, G., & Smith, A. D. (2021). Fast and memory-efficient mapping of short bisulfite sequencing reads using a two-letter alphabet. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(4), lqab115. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab115>
- Dhillon, W. S. (2007). Appetite regulation: An overview. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 17(5), 433-445. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0018>
- Dicken, M. S., Hughes, A. R., & Hentges, S. T. (2015). Gad1 mRNA as a reliable indicator of altered GABA release from orexigenic neurons in the hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 42(9), 2644-2653. <https://doi.org/10.1111/ejn.13076>
- Dicken, M. S., Tooker, R. E., & Hentges, S. T. (2012). Regulation of GABA and Glutamate Release from Proopiomelanocortin Neuron Terminals in Intact Hypothalamic Networks. *Journal of Neuroscience*, 32(12), 4042-4048. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6032-11.2012>
- Douglass, J. D., Dorfman, M. D., Fasnacht, R., Shaffer, L. D., & Thaler, J. P. (2017). Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism*, 6(4), 366-373. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.01.010>
- Dourmashkin, J. T., Chang, G.-Q., Gayles, E. C., Hill, J. O., Fried, S. K., Julien, C., & Leibowitz, S. F. (2005). Different forms of obesity as a function of diet composition. *International Journal of Obesity (2005)*, 29(11), 1368-1378. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803017>
- Dragano, N. R. V., Solon, C., Ramalho, A. F., de Moura, R. F., Razolli, D. S., Christiansen, E., Azevedo, C., Ulven, T., & Velloso, L. A. (2017). Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0869-7>
- Elias, C. F., Saper, C. B., Maratos-Flier, E., Tritos, N. A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J. B., Hoffman, G. E., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., & Elmquist, J. K. (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of Comparative Neurology*, 402(4), 442-459.
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., Jobst, E. E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S. K., Glavas, M. M., Grayson, B. E., Perello, M., Nillni, E. A., Grove, K. L., & Cowley, M. A. (2007). Diet-Induced Obesity Causes

- Severe but Reversible Leptin Resistance in Arcuate Melanocortin Neurons. *Cell Metabolism*, 5(3), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.004>
- Eskay, R. L., Giraud, P., Oliver, C., & Brown-Stein, M. J. (1979). Distribution of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the rat brain: Evidence that alpha-MSH-containing cells in the arcuate region send projections to extrahypothalamic areas. *Brain Research*, 178(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90087-8)
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8(3), 186-194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Huang, Q.-H., Tatro, J. B., Rand, W. M., Emerson, C. H., & Lechan, R. M. (2000). α -Melanocyte-Stimulating Hormone Is Contained in Nerve Terminals Innervating Thyrotropin-Releasing Hormone-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Prevents Fasting-Induced Suppression of Prothyrotropin-Releasing Hormone Gene Expression. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1550-1558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-04-01550.2000>
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J., & Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a are required for the maintenance of DNA methylation and synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature neuroscience*, 13(4), 423-430. <https://doi.org/10.1038/nn.2514>
- Field, A. E., Coakley, E. H., Must, A., Spadano, J. L., Laird, N., Dietz, W. H., Rimm, E., & Colditz, G. A. (2001). Impact of Overweight on the Risk of Developing Common Chronic Diseases During a 10-Year Period. *Archives of Internal Medicine*, 161(13), 1581-1586. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.13.1581>
- Fordahl, S. C., & Jones, S. R. (2017). High-Fat-Diet-Induced Deficits in Dopamine Terminal Function Are Reversed by Restoring Insulin Signaling. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(2), 290-299. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.6b00308>
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.

- Friso, S., Udali, S., De Santis, D., & Choi, S.-W. (2017). One-carbon metabolism and epigenetics. *Molecular Aspects of Medicine*, *54*, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.007>
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(5), 1827-1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- Gao, Q., Mezei, G., Nie, Y., Rao, Y., Choi, C. S., Bechmann, I., Leranth, C., Toran-Allerand, D., Priest, C. A., Roberts, J. L., Gao, X.-B., Mobbs, C., Shulman, G. I., Diano, S., & Horvath, T. L. (2007). Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nature Medicine*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nm1525>
- Garcia, M. de los A., Carrasco, M., Godoy, A., Reinicke, K., Montecinos, V. P., Aguayo, L. G., Tapia, J. C., Vera, J. C., & Nualart, F. (2001). Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Cellular Biochemistry*, *80*(4), 491-503. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010315\)80:4<491::AID-JCB1003>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010315)80:4<491::AID-JCB1003>3.0.CO;2-7)
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., & Carell, T. (2010). Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates. *PLOS ONE*, *5*(12), e15367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>
- Gómez-Valadés, A. G., Pozo, M., Varela, L., Boudjadja, M. B., Ramírez, S., Chivite, I., Eyre, E., Haddad-Tóvolli, R., Obri, A., Milà-Guasch, M., Altirriba, J., Schneeberger, M., Imbernón, M., Garcia-Rendueles, A. R., Gama-Perez, P., Rojo-Ruiz, J., Rácz, B., Alonso, M. T., Gomis, R., ... Claret, M. (2021). Mitochondrial cristae-remodeling protein OPA1 in POMC neurons couples Ca²⁺ homeostasis with adipose tissue lipolysis. *Cell Metabolism*, *33*(9), 1820-1835.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.008>
- Goni, L., Cuervo, M., Milagro, F. I., & Martínez, J. A. (2015). Future Perspectives of Personalized Weight Loss Interventions Based on Nutrigenetic, Epigenetic, and Metagenomic Data. *The Journal of Nutrition*, *146*(4), 905S-912S. <https://doi.org/10.3945/jn.115.218354>

- Gu, H., Smith, Z. D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., & Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature Protocols*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.190>
- Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F. T., & Benhattar, J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *International Journal of Cancer*, 101(4), 335-341. <https://doi.org/10.1002/ijc.10593>
- Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G., & Song, H. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nn.3607>
- Hagan, M. M., Rushing, P. A., Pritchard, L. M., Schwartz, M. W., Strack, A. M., Van Der Ploeg, L. H., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(83—132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(1), R47-52. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.1.R47>
- Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, 1(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/1082>
- Halpern, K. B., Vana, T., & Walker, M. D. (2014). Paradoxical Role of DNA Methylation in Activation of FoxA2 Gene Expression during Endoderm Development *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23882-23892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573469>
- Harno, E., Gali Ramamoorthy, T., Coll, A. P., & White, A. (2018). POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiological Reviews*, 98(4), 2381-2430. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2017>
- Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M., & Cedar, H. (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nature Genetics*, 34(2), 187-192. <https://doi.org/10.1038/ng1158>
- Haynes, V. R., Michael, N. J., van den Top, M., Zhao, F.-Y., Brown, R. D., De Souza, D., Dodd, G. T., Spanswick, D., & Watt, M. J. (2020). A

- Neural basis for Octanoic acid regulation of energy balance. *Molecular Metabolism*, *34*, 54-71. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.002>
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., & Glass, C. K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular Cell*, *38*(4), 576-589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>
- Hendren, N. S., de Lemos, J. A., Ayers, C., Das, S. R., Rao, A., Carter, S., Rosenblatt, A., Walchok, J., Omar, W., Khera, R., Hegde, A. A., Drazner, M. H., Neeland, I. J., & Grodin, J. L. (2021). Association of Body Mass Index and Age With Morbidity and Mortality in Patients Hospitalized With COVID-19. *Circulation*, *143*(2), 135-144. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051936>
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 48350-48359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403427200>
- Hook, V. Y., & Loh, Y. P. (1984). Carboxypeptidase B-like converting enzyme activity in secretory granules of rat pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(9), 2776-2780. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2776>
- Hopkins, M., & Blundell, J. E. (2016). Energy balance, body composition, sedentariness and appetite regulation: Pathways to obesity. *Clinical Science*, *130*(18), 1615-1628. <https://doi.org/10.1042/CS20160006>
- Hu, S., Wan, J., Su, Y., Song, Q., Zeng, Y., Nguyen, H. N., Shin, J., Cox, E., Rho, H. S., Woodard, C., Xia, S., Liu, S., Lyu, H., Ming, G.-L., Wade, H., Song, H., Qian, J., & Zhu, H. (2013). DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *eLife*, *2*, e00726. <https://doi.org/10.7554/eLife.00726>
- Hubbard, K., Shome, A., Sun, B., Pontré, B., McGregor, A., & Mountjoy, K. G. (2019). Chronic High-Fat Diet Exacerbates Sexually Dimorphic Pomctm1/tm1 Mouse Obesity. *Endocrinology*, *160*(5), 1081-1096. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00924>
- Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R. W., James, K. D., Turner, D. J., Smith, C., Harrison, D. J., Andrews, R., & Bird, A. P. (2010). Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved

- Promoters in the Mammalian Genome. *PLOS Genetics*, 6(9), e1001134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>
- Iyer, L. M., Tahiliani, M., Rao, A., & Aravind, L. (2009). Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(11), 1698-1710.
- Jenkins, J. S. (1972). The hypothalamus. *British Medical Journal*, 2(5805), 99-102.
- Jones, P. A. (1999). The DNA methylation paradox. *Trends in Genetics: TIG*, 15(1), 34-37. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01636-9](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01636-9)
- Jung, E. J., Kim, C. W., & Kim, D. R. (2008). Cytosolic accumulation of γ H2AX is associated with tropomyosin-related kinase A-induced cell death in U2OS cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 40(3), Article 3. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.3.276>
- Jung, E. J., & Kim, D. R. (2008). Apoptotic cell death in TrkA-overexpressing cells: Kinetic regulation of ERK phosphorylation and caspase-7 activation. *Molecules and Cells*, 26(1), 12-17.
- Kelmenson, P. (2018, abril 19). How to Refresh Your Mutant or Transgenic Mouse Strains. *The Jackson Laboratory*. <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2018/April/how-to-refresh-your-mutant-or-transgenic-mouse-strains>
- Kenchiah, S., Evans, J. C., Levy, D., Wilson, P. W. F., Benjamin, E. J., Larson, M. G., Kannel, W. B., & Vasan, R. S. (2002). Obesity and the Risk of Heart Failure. *New England Journal of Medicine*, 347(5), 305-313. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020245>
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrm2245>
- Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S. E., Castorena, C. M., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Morozov, Y. M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M. A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M. O., Gao, X.-B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*, 519(7541), Article 7541. <https://doi.org/10.1038/nature14260>
- Kohno, D., Lee, S., Harper, M. J., Kim, K. W., Sone, H., Sasaki, T., Kitamura, T., Fan, G., & Elmquist, J. K. (2014). Dnmt3a in Sim1 Neurons Is Necessary for Normal Energy Homeostasis. *The Journal of*

- Neuroscience*, 34(46), 15288-15296.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1316-14.2014>
- Kozlenkov, A., Roussos, P., Timashpolsky, A., Barbu, M., Rudchenko, S., Bibikova, M., Klotzle, B., Byne, W., Lyddon, R., Di Narzo, A. F., Hurd, Y. L., Koonin, E. V., & Dracheva, S. (2014). Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 109-127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt838>
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B. L., & Lowell, B. B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1424-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI46229>
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J., & Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393(6680), Article 6680. <https://doi.org/10.1038/29993>
- Krueger, F. (2016). *Babraham Bioinformatics—Trim Galore!* Babraham Bioinformatics. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Krueger, F. (2023). *Bismark* [HTML]. <https://github.com/FelixKrueger/Bismark/blob/1675a9c07b49d51cbf9ae42e9f4bbbbbde11f992f/Docs/FAQ.md> (Original work published 2015)
- Krueger, F., & Andrews, S. R. (2011). Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(11), 1571-1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
- LabDiet. (2023). *Product Support Materials*. <https://www.labdiet.com/resources/product-support-materials>
- Lam, B. Y. H., Cimino, I., Poley-Wolf, J., Nicole Kohnke, S., Rimmington, D., Iyemere, V., Heeley, N., Cossetti, C., Schulte, R., Saraiva, L. R., Logan, D. W., Blouet, C., O’Rahilly, S., Coll, A. P., & Yeo, G. S. H. (2017). Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Molecular Metabolism*, 6(5), 383-392. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.02.007>

- Lavoie, J.-F., Lesauteur, L., Kohn, J., Wong, J., Furtoss, O., Thiele, C. J., Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2005). TrkA induces apoptosis of neuroblastoma cells and does so via a p53-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29199-29207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502364200>
- Lazzarino, G. P., Andreoli, M. F., Rossetti, M. F., Stoker, C., Tschopp, M. V., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2017). Cafeteria diet differentially alters the expression of feeding-related genes through DNA methylation mechanisms in individual hypothalamic nuclei. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 450, 113-125. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.005>
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. A., & Levin, B. E. (2015). Role of FAT/CD36 in fatty acid sensing, energy, and glucose homeostasis regulation in DIO and DR rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(3), R188-R198. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00367.2014>
- Le Foll, C., Irani, B. G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. A., & Levin, B. E. (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), R655-R664. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00223.2009>
- Leibowitz, S. F., Dourmashkin, J. T., Chang, G.-Q., Hill, J. O., Gayles, E. C., Fried, S. K., & Wang, J. (2004). Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle. *Brain Research*, 1008(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.030>
- Lemus, M. B., Bayliss, J. A., Lockie, S. H., Santos, V. V., Reichenbach, A., Stark, R., & Andrews, Z. B. (2015). A stereological analysis of NPY, POMC, Orexin, GFAP astrocyte, and Iba1 microglia cell number and volume in diet-induced obese male mice. *Endocrinology*, 156(5), 1701-1713. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1961>
- Lever, J., Krzywinski, M., & Altman, N. (2017). Principal component analysis. *Nature Methods*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4346>
- Li, J., Wu, H., Liu, Y., & Yang, L. (2020). High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Experimental Animals*, 69(3), 326-335. <https://doi.org/10.1538/expanim.19-0148>

- Li, S.-J., Liu, W., Wang, J.-L., Zhang, Y., Zhao, D.-J., Wang, T.-J., & Li, Y.-Y. (2014). The role of TNF- α , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(6), 905-909.
- Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F. G., ... Ecker, J. R. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science*, 341(6146), 1237905. <https://doi.org/10.1126/science.1237905>
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), Article 7271. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, H., Liu, X., Zhang, S., Lv, J., Li, S., Shang, S., Jia, S., Wei, Y., Wang, F., Su, J., Wu, Q., & Zhang, Y. (2016). Systematic identification and annotation of human methylation marks based on bisulfite sequencing methylomes reveals distinct roles of cell type-specific hypomethylation in the regulation of cell identity genes. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 75-94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1332>
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O., & Cone, R. D. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 371(6500), Article 6500. <https://doi.org/10.1038/371799a0>
- Lu, X.-Y., Barsh, G. S., Akil, H., & Watson, S. J. (2003). Interaction between α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Feeding and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Responses. *Journal of Neuroscience*, 23(21), 7863-7872. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07863.2003>
- Lyu, P., Huang, Z., Feng, Q., Su, Y., Zheng, M., Hong, Y., Cai, X., & Lu, Z. (2020). Unveiling the transcriptome alteration of POMC neuron in diet-induced obesity. *Experimental Cell Research*, 389(1), 111848. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111848>

- Ma, L., Huang, C., Wang, X.-J., Xin, D. E., Wang, L., Zou, Q. C., Zhang, Y. S., Tan, M., Wang, Y., Zhao, T. C., Chatterjee, D., Altura, R. A., Wang, C., Xu, Y. S., Yang, J., Fan, Y., Han, B., Si, J., Zhang, X., ... Chin, Y. E. (2017). Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation. *Molecular Cell*, 65(2), 296-309. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.002>
- Marco, A., Kisliouk, T., Weller, A., & Meiri, N. (2013). High fat diet induces hypermethylation of the hypothalamic Pomc promoter and obesity in post-weaning rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38(12), 2844-2853. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.07.011>
- Matsushita, J., Okamura, K., Nakabayashi, K., Suzuki, T., Horibe, Y., Kawai, T., Sakurai, T., Yamashita, S., Higami, Y., Ichihara, G., Hata, K., & Nohara, K. (2018). The DNA methylation profile of liver tumors in C3H mice and identification of differentially methylated regions involved in the regulation of tumorigenic genes. *BMC Cancer*, 18(1), 317. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4221-0>
- Mattocks, D. A. L., Mentch, S. J., Shneyder, J., Ables, G. P., Sun, D., Richie, J. P., Locasale, J. W., & Nichenametla, S. N. (2017). Short term methionine restriction increases hepatic global DNA methylation in adult but not young male C57BL/6J mice. *Experimental Gerontology*, 88, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.003>
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., Johnson, B. E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V. M., Rowitch, D. H., Xing, X., Fiore, C., ... Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), Article 7303. <https://doi.org/10.1038/nature09165>
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., & Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868-5877. <https://doi.org/10.1093/nar/gki901>
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., & Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), Article 7205. <https://doi.org/10.1038/nature07107>

- Meng, Q., & Cai, D. (2011). Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I κ B Kinase β (IKK β)/NF- κ B Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32324-32332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254417>
- Mentch, S. J., & Locasale, J. W. (2016). One-carbon metabolism and epigenetics: Understanding the specificity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1363(1), 91-98. <https://doi.org/10.1111/nyas.12956>
- Ministerio de Salud. (2018). *Informe Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Estado Nutricional*. http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2021/06/Informe_estado_nutricional_ENS2016_2017.pdf
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R., Romanatto, T., Carvalheira, J. B., Oliveira, A. L. R., Saad, M. J., & Velloso, L. A. (2009). High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. *PLOS ONE*, 4(4), e5045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005045>
- Morello, G., Villari, A., Spampinato, A. G., La Cognata, V., Guarnaccia, M., Gentile, G., Ciotti, M. T., Calissano, P., D'Agata, V., Severini, C., & Cavallaro, S. (2021). Transcriptional Profiles of Cell Fate Transitions Reveal Early Drivers of Neuronal Apoptosis and Survival. *Cells*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/cells10113238>
- Morrison, C. D., Morton, G. J., Niswender, K. D., Gelling, R. W., & Schwartz, M. W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(6), E1051-E1057. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00094.2005>
- Morselli, E., Frank, A. P., Palmer, B. F., Rodriguez-Navas, C., Criollo, A., & Clegg, D. J. (2016). A sexually dimorphic hypothalamic response to chronic high-fat diet consumption. *International Journal of Obesity*, 40(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.114>
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
- Münzberg, H., Flier, J. S., & Bjørnbæk, C. (2004). Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice.

- Endocrinology*, 145(11), 4880-4889. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0726>
- Mwangi, S. M., Nezami, B. G., Obukwelu, B., Anitha, M., Marri, S., Fu, P., Epperson, M. F., Le, N.-A., Shanmugam, M., Sitaraman, S. V., Tseng, Y.-H., Anania, F. A., & Srinivasan, S. (2014). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(6), G515-G525. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00364.2013>
- Myers, M. G., & Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature*, 491(7424), 357-363. <https://doi.org/10.1038/nature11705>
- Nakamoto, K., Nishinaka, T., Sato, N., Mankura, M., Koyama, Y., Kasuya, F., & Tokuyama, S. (2013). Hypothalamic GPR40 Signaling Activated by Free Long Chain Fatty Acids Suppresses CFA-Induced Inflammatory Chronic Pain. *PLOS ONE*, 8(12), e81563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081563>
- Nanavaty, V., Abrash, E. W., Hong, C., Park, S., Fink, E. E., Li, Z., Sweet, T. J., Bhasin, J. M., Singuri, S., Lee, B. H., Hwang, T. H., & Ting, A. H. (2020). DNA Methylation Regulates Alternative Polyadenylation via CTCF and the Cohesin Complex. *Molecular Cell*, 78(4), 752-764.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.024>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247-257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- O'Malley, D., Reimann, F., Simpson, A. K., & Gribble, F. M. (2006). Sodium-Coupled Glucose Cotransporters Contribute to Hypothalamic Glucose Sensing. *Diabetes*, 55(12), 3381-3386. <https://doi.org/10.2337/db06-0531>
- Órdenes, P., Villar, P. S., Tarifeño-Saldivia, E., Salgado, M., Elizondo-Vega, R., Araneda, R. C., & García-Robles, M. A. (2021). Lactate activates hypothalamic POMC neurons by intercellular signaling. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00947-7>
- Orozco, L. D., Morselli, M., Rubbi, L., Guo, W., Go, J., Shi, H., Lopez, D., Furlotte, N. A., Bennett, B. J., Farber, C. R., Ghazalpour, A., Zhang, M. Q., Bahous, R., Rozen, R., Lusic, A. J., & Pellegrini, M. (2015). Epigenome-Wide Association of Liver Methylation Patterns and

- Complex Metabolic Traits in Mice. *Cell Metabolism*, 21(6), 905-917.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.025>
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M. G., & Ozcan, U. (2009). Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(1), 35-51. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.004>
- Padilla, S. L., Reef, D., & Zeltser, L. M. (2012). Defining POMC Neurons Using Transgenic Reagents: Impact of Transient Pomc Expression in Diverse Immature Neuronal Populations. *Endocrinology*, 153(3), 1219. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1665>
- Pan, H., Che, F.-Y., Peng, B., Steiner, D. F., Pintar, J. E., & Fricker, L. D. (2006). The role of prohormone convertase-2 in hypothalamic neuropeptide processing: A quantitative neuropeptidomic study. *Journal of Neurochemistry*, 98(6), 1763-1777. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04067.x>
- Pan, H., Nanno, D., Che, F.-Y., Zhu, X., Salton, S. R., Steiner, D. F., Fricker, L. D., & Devi, L. A. (2005). Neuropeptide Processing Profile in Mice Lacking Prohormone Convertase-1. *Biochemistry*, 44(12), 4939-4948. <https://doi.org/10.1021/bi047852m>
- Pedersen, L. H., Nielsen, J. E., Daugaard, G., Hansen, T. v. O., Rajpert-De Meyts, E., & Almstrup, K. (2016). Differences in global DNA methylation of testicular seminoma are not associated with changes in histone modifications, clinical prognosis, BRAF mutations or gene expression. *Cancer Genetics*, 209(11), 506-514. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.10.003>
- Pierroz, D. D., Ziotopoulou, M., Ungsunan, L., Moschos, S., Flier, J. S., & Mantzoros, C. S. (2002). Effects of Acute and Chronic Administration of the Melanocortin Agonist MTII in Mice With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 51(5), 1337-1345. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1337>
- Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., & Dudenhausen, J. W. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 20), 4963-4976. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176156>

- Quarta, C., Claret, M., Zeltser, L. M., Williams, K. W., Yeo, G. S. H., Tschöp, M. H., Diano, S., Brüning, J. C., & Cota, D. (2021). POMC neuronal heterogeneity in energy balance and beyond: An integrated view. *Nature Metabolism*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00345-3>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., & Manke, T. (2016). deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W160-W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Reilly, A. M., Zhou, S., Panigrahi, S. K., Yan, S., Conley, J. M., Sheets, P. L., Wardlaw, S. L., & Ren, H. (2019). Gpr17 deficiency in POMC neurons ameliorates the metabolic derangements caused by long-term high-fat diet feeding. *Nutrition & Diabetes*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0096-7>
- Research Diets, Inc. (2023). *D12492 Formula*. <https://researchdiets.com/formulas/d12492>
- Romanatto, T., Cesquini, M., Amaral, M. E., Roman, E. A., Moraes, J. C., Torsoni, M. A., Cruz-Neto, A. P., & Velloso, L. A. (2007). TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—Effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides*, 28(5), 1050-1058. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.006>
- Roth, T. L. (2012). Epigenetics of neurobiology and behavior during development and adulthood. *Developmental Psychobiology*, 54(6), 590-597. <https://doi.org/10.1002/dev.20550>
- Sa, M., Park, M. G., & Lee, and C. J. (2022). Role of Hypothalamic Reactive Astrocytes in Diet-Induced Obesity. *Molecules and Cells*, 45(2), 65-75. <https://doi.org/10.14348/molcells.2022.2044>
- Salgado, M., García-Robles, M. Á., & Sáez, J. C. (2021). Purinergic signaling in tanycytes and its contribution to nutritional sensing. *Purinergic Signalling*, 17(4), 607-618. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09791-w>
- Sato, A., Kawano, H., Notsu, T., Ohta, M., Nakakuki, M., Mizuguchi, K., Itoh, M., Suganami, T., & Ogawa, Y. (2010). Antiobesity Effect of

- Eicosapentaenoic Acid in High-Fat/High-Sucrose Diet–Induced Obesity. *Diabetes*, 59(10), 2495-2504. <https://doi.org/10.2337/db09-1554>
- Saucisse, N., Mazier, W., Simon, V., Binder, E., Catania, C., Bellocchio, L., Romanov, R. A., Léon, S., Matias, I., Zizzari, P., Quarta, C., Cannich, A., Meece, K., Gonzales, D., Clark, S., Becker, J. M., Yeo, G. S. H., Fioramonti, X., Merkle, F. T., ... Cota, D. (2021). Functional heterogeneity of POMC neurons relies on mTORC1 signaling. *Cell Reports*, 37(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109800>
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1997). Leptin Increases Hypothalamic Pro-opiomelanocortin mRNA Expression in the Rostral Arcuate Nucleus. *Diabetes*, 46(12), 2119-2123. <https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2119>
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Zeltser, L. M., Drewnowski, A., Ravussin, E., Redman, L. M., & Leibel, R. L. (2017). Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 38(4), 267-296. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00111>
- Shen, Y., Zhou, S., Zhao, X., Li, H., & Sun, J. (2020). Characterization of Genome-Wide DNA Methylation and Hydroxymethylation in Mouse Arcuate Nucleus of Hypothalamus During Puberty Process. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.626536>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216-221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Shi, X., Wang, X., Li, Q., Su, M., Chew, E., Wong, E. T., Lacza, Z., Radda, G. K., Tergaonkar, V., & Han, W. (2013). Nuclear factor κ B (NF- κ B) suppresses food intake and energy expenditure in mice by directly activating the Pomc promoter. *Diabetologia*, 56(4), 925-936. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2831-2>
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., & Oberdoerffer, S. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, 479(7371), 74-79. <https://doi.org/10.1038/nature10442>

- Siegel, G. J., & Chauhan, N. B. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews*, 33(2), 199-227. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00030-8)
- Silva, J. P., Lambert, G., van Booven, D., & Wahlestedt, C. (2016). Epigenomic and metabolic responses of hypothalamic POMC neurons to gestational nicotine exposure in adult offspring. *Genome Medicine*, 8(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0348-2>
- Smith, A. I., & Funder, J. W. (1988). Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central Nervous System, and Peripheral Tissues. *Endocrine Reviews*, 9(1), 159-179. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-1-159>
- Spanswick, D., Smith, M. A., Mirshamsi, S., Routh, V. H., & Ashford, M. L. J. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature Neuroscience*, 3(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/77660>
- Su, Y., Wang, W., & Meng, X. (2022). Revealing the Roles of MOAP1 in Diseases: A Review. *Cells*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/cells11050889>
- Sun, M., Choi, E. Y., Magee, D. J., Stets, C. W., During, M. J., & Lin, E.-J. D. (2014). Metabolic Effects of Social Isolation in Adult C57BL/6 Mice. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 690950. <https://doi.org/10.1155/2014/690950>
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes*, 37(9), 1163-1167. <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Tan, K. O., Tan, K. M. L., Chan, S.-L., Yee, K. S. Y., Bévort, M., Ang, K. C., & Yu, V. C. (2001). MAP-1, a Novel Proapoptotic Protein Containing a BH3-like Motif That Associates with Bax through Its Bcl-2 Homology Domains *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2802-2807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008955200>
- Tate, P. H., & Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(2), 226-231. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(93\)90027-m](https://doi.org/10.1016/0959-437x(93)90027-m)

- Thaler, J. P., Yi, C.-X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., Zhao, X., Sarruf, D. A., Izgur, V., Maravilla, K. R., Nguyen, H. T., Fischer, J. D., Matsen, M. E., Wisse, B. E., Morton, G. J., Horvath, T. L., Baskin, D. G., Tschöp, M. H., & Schwartz, M. W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(1), 153-162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- Thorvaldssdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, *14*(2), 178-192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J. E., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience*, *11*(9), 998-1000. <https://doi.org/10.1038/nn.2167>
- Valdearcos, M., Robblee, M. M., Benjamin, D. I., Nomura, D. K., Xu, A. W., & Koliwad, S. K. (2014). Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell Reports*, *9*(6), 2124-2138. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.018>
- van der Wijst, M. G. P., van Tilburg, A. Y., Ruiters, M. H. J., & Rots, M. G. (2017). Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. *Scientific Reports*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00263-z>
- Venolia, L., & Gartler, S. M. (1983). Comparison of transformation efficiency of human active and inactive X-chromosomal DNA. *Nature*, *302*(5903), 82-83. <https://doi.org/10.1038/302082a0>
- Wang, C., He, Y., Xu, P., Yang, Y., Saito, K., Xia, Y., Yan, X., Hinton Jr, A., Yan, C., Ding, H., Yu, L., Shu, G., Gupta, R., Wu, Q., Tong, Q., Lagor, W. R., Flores, E. R., & Xu, Y. (2018). TAp63 contributes to sexual dimorphism in POMC neuron functions and energy homeostasis. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03796-7>
- Wang, C., & Xu, Y. (2019). Mechanisms for sex differences in energy homeostasis. *Journal of Molecular Endocrinology*, *62*(2), R129-R143. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0165>

- Wang, C.-Y., & Liao, J. K. (2012). A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 821, 421-433. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8_27
- Wang, L., Saint-Pierre, D. H., & Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y – synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, 325(1), 47-51. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00241-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00241-0)
- Wardlaw, S. L. (2011). Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 213-219. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.107>
- Watt, F., & Molloy, P. L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & Development*, 2(9), 1136-1143. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1136>
- White, C. L., Whittington, A., Barnes, M. J., Wang, Z., Bray, G. A., & Morrison, C. D. (2009). HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(2), E291-E299. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90513.2008>
- Williams, K. W., Liu, T., Kong, X., Fukuda, M., Deng, Y., Berglund, E. D., Deng, Z., Gao, Y., Liu, T., Sohn, J.-W., Jia, L., Fujikawa, T., Kohno, D., Scott, M. M., Lee, S., Lee, C. E., Sun, K., Chang, Y., Scherer, P. E., & Elmquist, J. K. (2014). Xbp1s in Pomc Neurons Connects ER Stress with Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism*, 20(3), 471-482. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.002>
- Williams, K. W., Margatho, L. O., Lee, C. E., Choi, M., Lee, S., Scott, M. M., Elias, C. F., & Elmquist, J. K. (2010). Segregation of Acute Leptin and Insulin Effects in Distinct Populations of Arcuate Proopiomelanocortin Neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2472-2479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>
- Wingett, S. (2011). *Babraham Bioinformatics—FastQ Screen* [Perl]. Babraham Bioinformatics. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/
- Wirawan, E., Lippens, S., Vanden Berghe, T., Romagnoli, A., Fimia, G. M., Piacentini, M., & Vandenabeele, P. (2012). Beclin1: A role in

- membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 8(1), 6-17. <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.16645>
- Wittmann, G., Hrabovszky, E., & Lechan, R. M. (2013). Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *Journal of Comparative Neurology*, 521(14), 3287-3302. <https://doi.org/10.1002/cne.23350>
- World Health Organization. (2021, junio 9). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xie, W., Barr, C. L., Kim, A., Yue, F., Lee, A. Y., Eubanks, J., Dempster, E. L., & Ren, B. (2012). Base-Resolution Analyses of Sequence and Parent-of-Origin Dependent DNA Methylation in the Mouse Genome. *Cell*, 148(4), 816-831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.035>
- Yamazaki, M., Munetsuna, E., Yamada, H., Ando, Y., Mizuno, G., Murase, Y., Kondo, K., Ishikawa, H., Teradaira, R., Suzuki, K., & Ohashi, K. (2016). Fructose consumption induces hypomethylation of hepatic mitochondrial DNA in rats. *Life Sciences*, 149, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.020>
- Yang, G., Lim, C.-Y., Li, C., Xiao, X., Radda, G. K., Li, C., Cao, X., & Han, W. (2009). FoxO1 inhibits leptin regulation of pro-opiomelanocortin promoter activity by blocking STAT3 interaction with specificity protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3719-3727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804965200>
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D. D., Lay, F. D., Jones, P. A., & Liang, G. (2014). Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell*, 26(4), 577-590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>
- Yu, L., Saarma, M., & Arumäe, U. (2008). Death Receptors and Caspases But Not Mitochondria Are Activated in the GDNF- or BDNF-Deprived Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(30), 7467-7475. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1877-08.2008>
- Yun, R., Dourmashkin, J. T., Hill, J., Gayles, E. C., Fried, S. K., & Leibowitz, S. F. (2005). PVN galanin increases fat storage and promotes obesity by causing muscle to utilize carbohydrate more than fat. *Peptides*, 26(11), 2265-2273. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.005>

- Zabolotny, J. M., Kim, Y.-B., Welsh, L. A., Kershaw, E. E., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2008). Protein-tyrosine Phosphatase 1B Expression Is Induced by Inflammation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14230-14241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>
- Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J., Lin, S., Bao, J., Wu, P., & Luo, M. (2013). Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. *The Journal of Neuroscience*, 33(8), 3624-3632. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., & Cai, D. (2008). Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*, 135(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.043>
- Zhang, X., Zhang, S., Ma, L., Jiang, E., Xu, H., Chen, R., Yang, Q., Chen, H., Li, Z., & Lan, X. (2017). Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) of dairy goat mammary glands reveals DNA methylation profiles of integrated genome-wide and critical milk-related genes. *Oncotarget*, 8(70), 115326-115344. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23260>
- Zhang, Y., Reichel, J. M., Han, C., Zuniga-Hertz, J. P., & Cai, D. (2017). Astrocytic Process Plasticity and IKK β /NF- κ B in Central Control of Blood Glucose, Blood Pressure, and Body Weight. *Cell Metabolism*, 25(5), 1091-1102.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.002>
- Zheng, L. D., Linarelli, L. E., Liu, L., Wall, S. S., Greenawald, M. H., Seidel, R. W., Estabrooks, P. A., Almeida, F. A., & Cheng, Z. (2015). Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese humans. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0093-1>
- Zhu, H., Wang, G., & Qian, J. (2016). Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nature Reviews Genetics*, 17(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.83>

VIII. ANEXOS

Scripts de bash del control de calidad y procesamiento

Anexo 1. Control de calidad de los datos crudos mediante *FastQC*.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
fastqc $RRBS-EE-C* --adapters $adaptadores.txt -o $output_path
fastqc $ RRBS-EE-HFD* --adapters $adaptadores.txt -o
$output_path
```

Anexo 2: Procesamiento de los datos mediante *TrimGalore* y posterior evaluación de calidad de datos procesados mediante *FastQC*.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
trim_galore --cores 4 --rrbs --paired --gzip --max_n 15 --length
50 --non_directional -o $output_path \
$RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001.fastq.gz \
$RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001.fastq.gz

fastqc
$RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001_val_1.fq.gz \
--adapters $adaptadores.txt -o $output_path/FastQC
```

Anexo3: Alineamiento múltiple mediante el programa *Fastq-screen*

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
fastq_screen --aligner bowtie2 --bisulfite --threads 4 \
--get_genomes --bismark --non_directional \
--outdir $Output_Path/ \
$RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001.fastq.gz
```

Scripts de bash del alineamiento al genoma de referencia

Anexo 4: Preparación del genoma de referencia mediante *Bismark*.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark_genome_preparation --path_to_aligner
/usr/local/src/bowtie2-2.5.0-linux-x86_64 \
--bowtie2 --genomic_composition --verbose \
$Annotation/
```

Anexo 5a: Alineamiento al genoma de referencia usando *Bismark*.

Configuración por defecto, test 1

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark --parallel 4 --gzip --bam --output_dir $output_path \
--temp_dir $output_path \
--genome_folder $Annotation \
-1 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001_val_1.fq.gz
\
-2 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001_val_2.fq.gz
```

Anexo 5b: Alineamiento al genoma de referencia usando *Bismark*.

Configuración no direccional, test 2.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark --parallel 4 --gzip --bam --non_directional --output_dir
$output_path/ \
--temp_dir $output_path \
--genome_folder $Annotation \
-1 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001_val_1.fq.gz
\
-2 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001_val_2.fq.gz
```

Anexo 5c: Alineamiento al genoma de referencia usando *Bismark*. Configuración no direccional con disminución en exigencia, test 3.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark --parallel 4 --gzip --bam --non_directional --output_dir
$output_path/ \
--temp_dir $output_path \
--score_min L,0,-0.6 \
--genome_folder $Annotation \
-1 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001_val_1.fq.gz
\
-2 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001_val_2.fq.gz
```

Anexo 5d: Alineamiento al genoma de referencia usando *Bismark*. Configuración no direccional, con disminución en exigencia y alineamiento local, test 4.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark --parallel 4 --gzip --bam --non_directional --output_dir
$output_path/ \
--temp_dir $output_path \
--score_min L,0,-0.6 \
--local \
--genome_folder $Annotation \
-1 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R1_001_val_1.fq.gz
\
-2 $RRBS-EE-C1_NGS22-Y096_BH3LN7DSX5_S24_L004_R2_001_val_2.fq.gz
```

Anexo 6: Extracción del estado de metilación de citosinas usando Bismark.

```
#!/bin/bash
eval "$(conda shell.bash hook)"
bismark_methylation_extractor --paired-end --no_overlap --
ignore_r2 2 --report --merge_non_CpG --bedgraph --gzip \
--output $Output_path \
$RRBS-EE-C1.bam
```

Test de metilación diferencial en R

Anexo 7: Test de metilación diferencial usando el programa *MethylKit*.

```
library(devtools)
library(methylKit)
library(genomation)

file.list=list( "C1.bismark.cov.gz",
               "C5.bismark.cov.gz",
               "HFD1.bismark.cov.gz",
               "HFD2.bismark.cov.gz")

myobjDB=methRead(file.list,
                 sample.id=list("C1","C5","HFD1","HFD2"),
                 assembly="GRCm39",
                 treatment=c(0,0,1,1),
                 context="CpG",
                 pipeline = "bismarkCoverage")

#Cobertura por base-----
getCoverageStats(myobjDB[[1]],plot=TRUE,both.strands=FALSE)
getCoverageStats(myobjDB[[2]],plot=TRUE,both.strands=FALSE)
getCoverageStats(myobjDB[[3]],plot=TRUE,both.strands=FALSE)
getCoverageStats(myobjDB[[4]],plot=TRUE,both.strands=FALSE)

# Filtro basado en cobertura-----
```

```

filtered.myobj=filterByCoverage(myobjDB, lo.count=10, lo.perc=NULL
, hi.count=NULL, hi.perc=99.9)
normalized.myobj=normalizeCoverage(filtered.myobj)

#Correlación de muestras-----
meth=unite(normalized.myobj, destrand=FALSE)
getCorrelation(meth, plot=TRUE)
clusterSamples(meth, dist="correlation", method="ward.D2", plot=TRUE)
PCASamples(meth, screeplot=TRUE)
PCASamples(meth, center = TRUE)

#Metilación diferencial por citocina (DMC)-----
myDiff=calculateDiffMeth(meth)
myDiff25p.hyper=getMethylDiff(myDiff, difference=25, qvalue=0.05, type="hyper")
myDiff25p.hypo=getMethylDiff(myDiff, difference=25, qvalue=0.05, type="hypo")

#DMC por cromosoma-----
diffMethPerChr(myDiff, plot=TRUE, qvalue.cutoff=0.05, meth.cutoff=15)

#Metilación diferencial por region (DMR)-----
tiles=tileMethylCounts(myobjDB, win.size=1000, step.size=1000)
filtered.myobj_R=filterByCoverage(tiles, lo.count=10, lo.perc=NULL
, hi.count=NULL, hi.perc=99.9)
normalized.myobj_R=normalizeCoverage(filtered.myobj_R)

methRegion=unite(normalized.myobj_R, destrand=FALSE)
myDiffRegion=calculateDiffMeth(methRegion)
myDiffRegion.hyper=getMethylDiff(myDiffRegion, difference=15, qvalue=0.05, type="hyper")
myDiffRegion.hypo=getMethylDiff(myDiffRegion, difference=15, qvalue=0.05, type="hypo")

```

```

#Metilación diferencial por promotor-----
methPromoter=unite(normalized.promoter, destrand=FALSE)
myDiffPromoter=calculateDiffMeth(methPromoter)
myDiffPromoter.hyper=getMethylDiff(myDiffPromoter,difference=15,
qvalue=0.05,type="hyper")
myDiffPromoter.hypo=getMethylDiff(myDiffPromoter,difference=15,q
value=0.05,type="hypo")

#Anotación de metilación diferencial-----
#Cargar archivo bed con anotación
gene.obj=readTranscriptFeatures("Mus_musculus.GRCm39.107_2_BED12
.bed", remove.unusual = TRUE)
diffAnn_hyper <-
annotateWithGeneParts(as(myDiff25p.hyper,"GRanges"),gene.obj)
diffAnn_hypo <-
annotateWithGeneParts(as(myDiff25p.hypo,"GRanges"),gene.obj)
diffAnn_RegionHyper <-
annotateWithGeneParts(as(myDiffRegion.hyper,"GRanges"),gene.obj)
diffAnn_RegionHypo <-
annotateWithGeneParts(as(myDiffRegion.hypo,"GRanges"),gene.obj)

#Calculo distancia a TSS
TSS <- getAssociationWithTSS(diffAnn)

#Extracción de genes con promotores diferencialmente metilados
diffAnn_Promoter.hyper=annotateWithGeneParts(as(myDiffPromoter.h
yper,"GRanges"),gene.obj)
diffAnn_Promoter.hypo=annotateWithGeneParts(as(myDiffPromoter.hy
po,"GRanges"),gene.obj)
write.table(getAssociationWithTSS(diffAnn_Promoter.hyper),
file="Hyper-TSS_PorPromoter_Methylkit")
write.table(getAssociationWithTSS(diffAnn_Promoter.hypo),
file="Hypo-TSS_PorPromoter_Methylkit")

```

Figuras suplementarias.

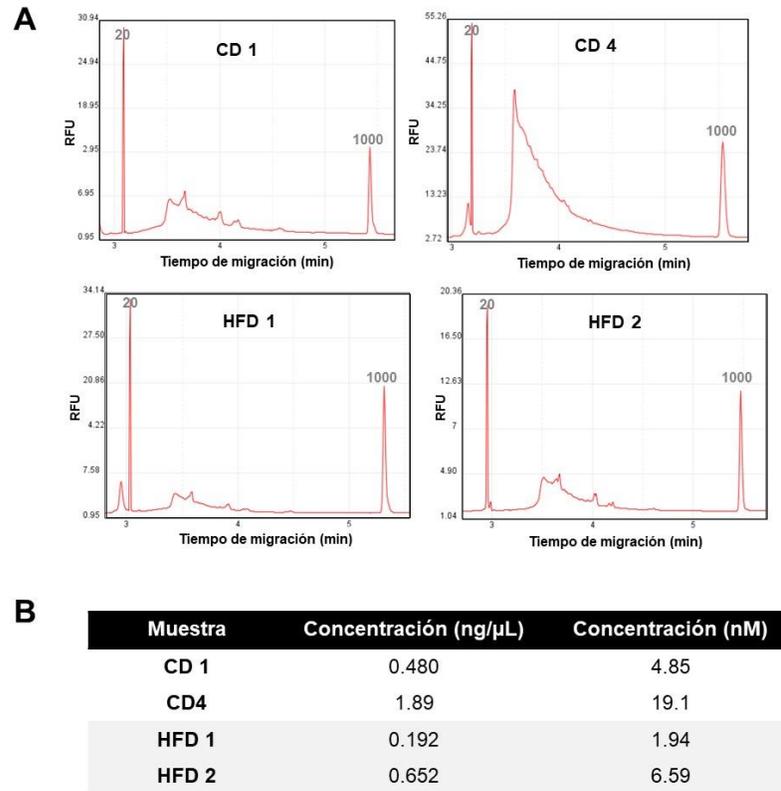


Figura S1: Calidad de librerías RRBS (A) Perfil electroforético de las librerías RRBS de la condición CD y HFD. Las señales indicadas con 20 y 1000 corresponden al marcador de peso molecular. **(B)** Valores de concentración de cada una de las muestras en términos de ng/ μ L (medida por Qubit) y concentración nanomolar, determinada a partir de la Formula n°1.

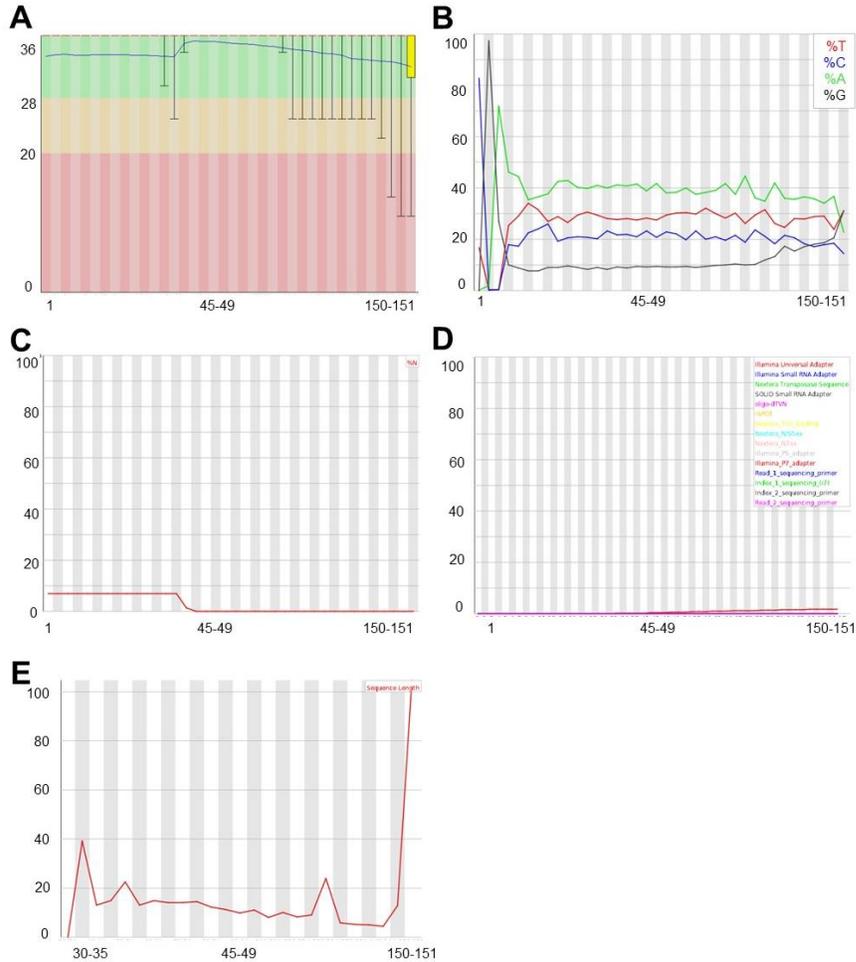


Figura S2: Resultados de la calidad de los datos crudos obtenida mediante FastQC. (A) Calidad phred de base a lo largo de la secuencia. **(B)** Contenido de base por secuencia. En el eje de las abscisas se observa la posición a lo largo de la secuencia y en el eje de las ordenadas el porcentaje de aparición de cada base. **(C)** Presencia de adaptadores a lo largo de las secuencias. **(D)** Presencia de bases no determinadas a lo largo de las secuencias. **(E)** Distribución de longitud de las secuencias. Estos resultados corresponden a la muestra CD1, sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el resto de las muestras.

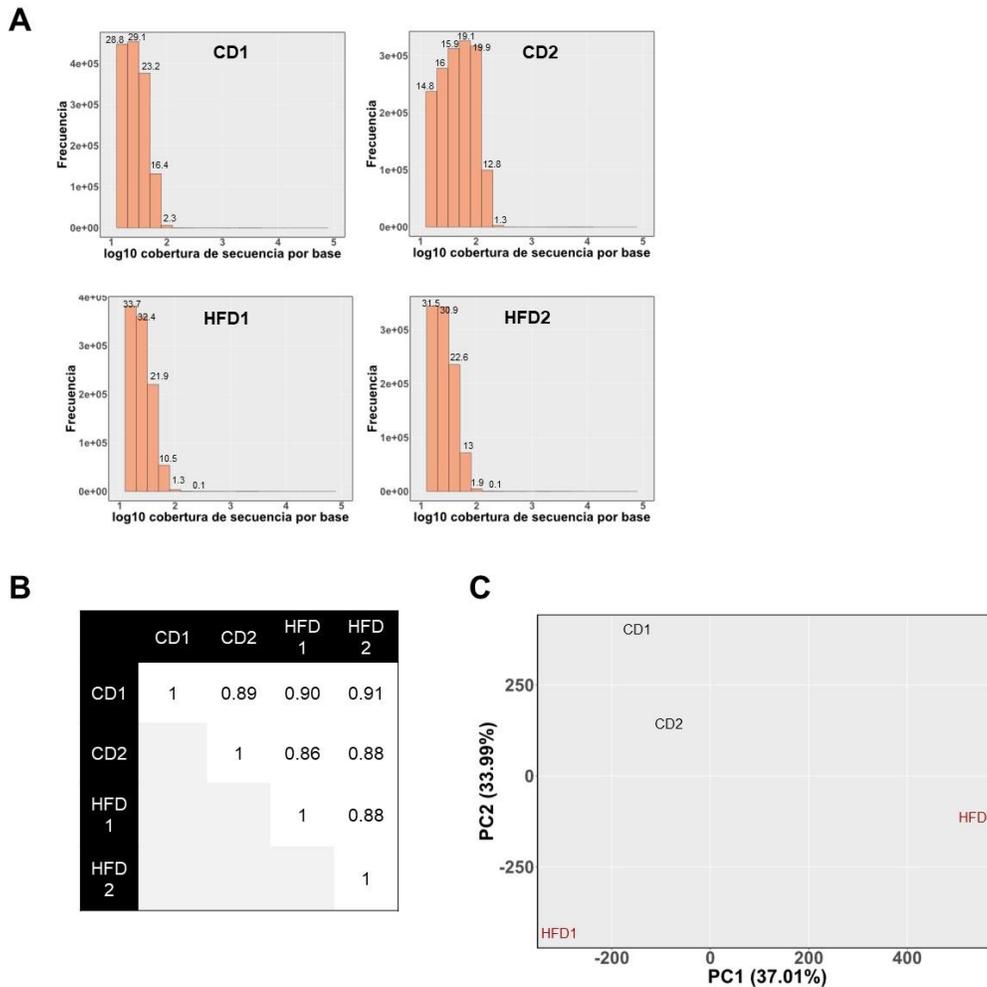


Figura S3: Estadística descriptiva de los datos de metilación en el contexto CpG para cada muestra. (A) Histograma con la frecuencia de cobertura de secuencias por base. Los valores sobre cada barra representan el porcentaje de citosinas que coinciden con una misma cobertura. El resultado de este análisis muestra que las 4 muestras tienen una cobertura por base distribuida entre 10 y 100, no obstante, en CD2 se observa que aproximadamente un 15% de las bases tienen una cobertura superior a 100, lo que refleja que esta muestra sufrió sesgo de PCR. Como solución a este problema, se filtró y normalizó cada muestra de manera independiente, para

eliminar aquellas bases con una cobertura superior a 99.9 **(B)** Matriz con coeficientes de correlación de Pearson entre pares entre las 4 muestras. **(C)** Análisis de componente principal para dos muestras CD y dos muestras HFD. Si bien no hay una agrupación notoria de las muestras por condición, se tiende a ver una cercanía de las muestras CD en el componente 1, y de ambas muestras HFD en el componente 2.



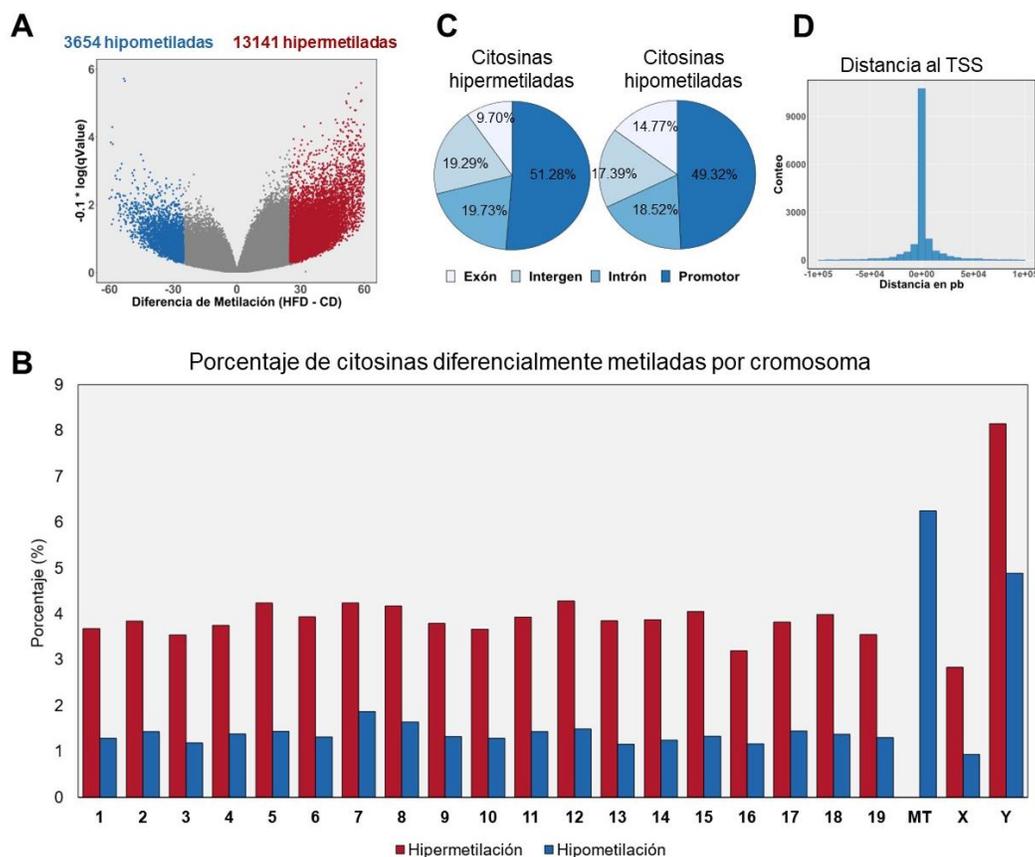


Figura S4: Análisis de metilación diferencial a resolución de una base. (A) Volcano plot de citosinas diferencialmente metiladas (DMC), distribuidas de acuerdo con la diferencia de metilación entre el grupo HFD y CD; y la significancia definida por el valor q. Los puntos en rojo corresponden a citosinas hipermetiladas en el grupo HFD relativo al grupo CD y en azul se representan las citosinas hipometiladas. Los puntos en gris constituyen citosinas sin metilación diferencial. Se definió la metilación diferencial con una diferencia de metilación sobre 25% y un valor q menor o igual a 0.05. (B) Porcentaje de citosinas diferencialmente metiladas (DMC) en cada uno de los cromosomas, distinguiendo entre hiper e hipometilación. Desde lo cual se evidencia que, a excepción del cromosoma mitocondrial

(MT), todos los cromosomas alcanzan mayor nivel de hipermetilación que de hipometilación, cercano al 3% y 1% respectivamente. Interesantemente, se observa, además, que el cromosoma Y posee un porcentaje de metilación diferencial mayor que el resto de los cromosomas, reflejado tanto a nivel de hiper como hipometilación (C) Distribución de citosinas hiper e hipometiladas por estructura génica. (D) Distribución de la distancia al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del total de citosinas diferencialmente metiladas (DMC).



Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC	% de cambio de metilación	Log2 veces de cambio de abundancia de ARN
Ntrk1-mC1	<i>Ntrk1</i>	87702260	32,943	-24,137
Ntrk1-mC2	<i>Ntrk1</i>	87702307	-33,824	-24,137
Gdnf-mC1	<i>Gdnf</i>	7838848	25,771	-23,080
Gdnf-mC2	<i>Gdnf</i>	7838907	39,407	-23,080
Gdnf-mC3	<i>Gdnf</i>	7840664	39,483	-23,080
Gdnf-mC4	<i>Gdnf</i>	7840666	38,012	-23,080
Crlf1-mC1	<i>Crlf1</i>	70943986	25,524	20,550
Crlf1-mC2	<i>Crlf1</i>	70946033	36,661	20,550
Crlf1-mC3	<i>Crlf1</i>	70954803	29,938	20,550
Crlf1-mC4	<i>Crlf1</i>	70956061	-30,275	20,550
Crlf1-mC5	<i>Crlf1</i>	70956025	-34,329	20,550
Crlf1-mC6	<i>Crlf1</i>	70956094	-26,157	20,550
Hmga2	<i>Hmga2</i>	120311724	28,571	-22,855
Cdk1	<i>Cdk1</i>	69188256	39,743	-21,841
Ccno	<i>Ccno</i>	113124160	26,389	20,169
Tgm1	<i>Tgm1</i>	55950932	-33,543	19,768
Kif22	<i>Kif22</i>	126641505	25,676	19,531
Tph2	<i>Tph2</i>	115009533	40,905	19,867
Gal	<i>Gal</i>	3464396	31,347	2,009
F7	<i>F7</i>	13078723	47,987	-22,453
Foxc2-mC1	<i>Foxc2</i>	121842089	25,714	-23,640
Foxc2-mC2	<i>Foxc2</i>	121843947	41,448	-23,640
Foxc2-mC3	<i>Foxc2</i>	121844019	-32,159	-23,640
Plpp4	<i>Plpp4</i>	128858829	26,696	-22,228
Apoh	<i>Apoh</i>	108234163	43,942	20,646
Cyp26a1-mC1	<i>Cyp26a1</i>	37686496	29,993	19,886
Cyp26a1-mC2	<i>Cyp26a1</i>	37687553	39,382	19,886
Cyp26a1-mC3	<i>Cyp26a1</i>	37687649	26,807	19,886
Rab38	<i>Rab38</i>	88079378	27,439	19,891

Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC	% de cambio de metilación	Log2 veces de cambio de abundancia de ARN
Gpsm3	<i>Gpsm3</i>	34808843	59,241	20,933
Syk-mC1	<i>Syk</i>	52736867	-25,211	19,743
Syk-mC2	<i>Syk</i>	52737986	31,037	19,743
Crhbp	<i>Crhbp</i>	95579603	32,009	19,707
Loxl3	<i>Loxl3</i>	83015595	31,881	10,050
Bcl6b	<i>Bcl6b</i>	70117437	-41,569	21,073
Ltb4r1	<i>Ltb4r1</i>	56005452	60,920	19,847
Hmx3-mC1	<i>Hmx3</i>	131144009	43,012	21,442
Hmx3-mC2	<i>Hmx3</i>	131144610	38,526	21,442
Hmx3-mC3	<i>Hmx3</i>	131145067	28,220	21,442
Tnfrsf12a	<i>Tnfrsf12a</i>	23896317	27,333	9,304
Irx4-mC1	<i>Irx4</i>	73408978	52,381	-22,841
Irx4-mC2	<i>Irx4</i>	73409646	38,121	-22,841
Vegfc	<i>Vegfc</i>	54530786	45,000	-22,315
Pax2-mC1	<i>Pax2</i>	44744709	27,273	-22,220
Pax2-mC2	<i>Pax2</i>	44747357	35,777	-22,220
Pax2-mC3	<i>Pax2</i>	44749265	30,567	-22,220
Pax2-mC4	<i>Pax2</i>	44749389	-25,275	-22,220
Pax2-mC5	<i>Pax2</i>	44749437	-25,144	-22,220
Pax2-mC6	<i>Pax2</i>	44749657	27,128	-22,220
Efcab9	<i>Efcab9</i>	32481982	29,435	-23,173
Fstl3	<i>Fstl3</i>	79612980	34,503	8,834
Cnmd	<i>Cnmd</i>	79899023	30,636	-23,759
Hmx2-mC1	<i>Hmx2</i>	131151169	26,566	20,349
Hmx2-mC2	<i>Hmx2</i>	131156150	-25,758	20,349
Foxb2	<i>Foxb2</i>	16850372	34,821	-23,549
Bhlha9-mC1	<i>Bhlha9</i>	76564030	32,613	-23,094
Bhlha9-mC2	<i>Bhlha9</i>	76564093	-33,000	-23,094
Foxb1-mC1	<i>Foxb1</i>	69667287	25,077	-25,005
Foxb1-mC2	<i>Foxb1</i>	69667517	30,841	-25,005
Bnc1	<i>Bnc1</i>	81642671	-28,722	-22,913

Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC	% de cambio de metilación	Log2 veces de cambio de abundancia de ARN
Emx1-mC1	<i>Emx1</i>	85164867	28,302	-22,587
Emx1-mC2	<i>Emx1</i>	85171506	26,029	-22,587
Ascl4-mC1	<i>Ascl4</i>	85763960	29,630	-22,913
Ascl4-mC2	<i>Ascl4</i>	85764376	33,277	-22,913
Irx5-mC1	<i>Irx5</i>	93086264	-31,699	21,581
Tcf15	<i>Tcf15</i>	151985372	28,997	19,736
Foxi2-mC1	<i>Foxi2</i>	135012253	-53,190	-22,909
Foxi2-mC2	<i>Foxi2</i>	135012370	-30,789	-22,909
Foxi2-mC3	<i>Foxi2</i>	135013641	28,652	-22,909
Foxi2-mC4	<i>Foxi2</i>	135013742	43,617	-22,909
Fhl2	<i>Fhl2</i>	43202940	29,175	-23,248
Pax5-mC1	<i>Pax5</i>	44646272	-30,155	-22,141
Pax5-mC2	<i>Pax5</i>	44703436	38,001	-22,141
Pax5-mC3	<i>Pax5</i>	44703779	35,354	-22,141
Pax5-mC4	<i>Pax5</i>	44703849	28,011	-22,141
Pax5-mC5	<i>Pax5</i>	44703952	-35,804	-22,141
Pax5-mC6	<i>Pax5</i>	44704044	29,606	-22,141
Vax1-mC1	<i>Vax1</i>	59157125	30,914	21,923
Vax1-mC2	<i>Vax1</i>	59157973	30,928	21,923
Vax1-mC3	<i>Vax1</i>	59158091	33,983	21,923
Vax1-mC4	<i>Vax1</i>	59158374	42,939	21,923
Vax1-mC5	<i>Vax1</i>	59160467	49,747	21,923
Meox1-mC1	<i>Meox1</i>	101784592	31,097	19,520
Meox1-mC2	<i>Meox1</i>	101784603	25,903	19,520
Pou4f1-mC1	<i>Pou4f1</i>	104703385	36,000	19,580
Pou4f1-mC2	<i>Pou4f1</i>	104705763	28,479	19,580
Runx2	<i>Runx2</i>	45047330	44,765	22,628
Zfp296	<i>Zfp296</i>	19312257	-30,697	-22,283

Nomenclatura	Nombre del gen	Posición de DMC	% de cambio de metilación	Log2 veces de cambio de abundancia de ARN
Zfp296	<i>Zfp296</i>	19312257	-30,697	-22,283
Acvr11-mC1	<i>Acvr11</i>	101026907	51,724	21,808
Acvr11-mC2	<i>Acvr11</i>	101027035	25,789	21,808
Acvr11-mC3	<i>Acvr11</i>	101027038	28,325	21,808
Zfp593-mC1	<i>Zfp593</i>	133972737	34,950	9,058
Zfp593-mC2	<i>Zfp593</i>	133972738	30,548	9,058
Irx5-mC2	<i>Irx5</i>	93086876	30,206	21,581

Figura S5: Tabla con detalle de la nomenclatura utilizada en la figura 12B, el nombre del gen, la posición genómica de cada DMC, el porcentaje de cambio de metilación (HFD versus CD) y el logaritmo en base 2, de las veces de cambio en la abundancia de ARN (cambio de expresión, log₂FC).

